

**Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 13  
(SCA13) bei Ataxie-Patienten: Screening auf  
Mutationen im *KCNC3*-Gen unter besonderer  
Berücksichtigung des Exons 1**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Lea-Theresa Ley  
aus Wiesbaden

Gießen 2018

Aus dem Institut für Humangenetik unter der  
Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-  
Universität Gießen

Gutachterin:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Neubauer

Tag der Disputation:

06.12.2018

Wesentliche Teile der Arbeit wurden 2016 als Poster auf der Humangenetik-Tagung in Lübeck präsentiert:

Ley, L.-T.; Kang, J. S.; Stanek, S.; Mueller, U.; Nolte, D. (2016):

Detection of a KCNC3 promotor variant in an ataxia patient: Rare polymorphism, or disease-causing mutation? *Medizinische Genetik*: 28, 197.

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1. Klassifikation der Ataxien .....	1
1.2. Sporadische Ataxien .....	1
1.2.1. Symptomatische Ataxien .....	2
1.2.2. Idiopathische Ataxien .....	2
1.3. Hereditäre Ataxien.....	3
1.3.1. Mitochondriale Ataxien .....	3
1.3.2. X-chromosomale Ataxien .....	4
1.3.3. Autosomale Rezessive Ataxien.....	5
1.3.4. Autosomal Dominate Ataxien (ADCA).....	6
1.4. Spinocerebelläre Ataxien.....	7
1.4.1. CAG-Repeat-Expansion im codierenden Bereich .....	9
1.4.2. Repeat-Expansion im nicht-codierenden Bereich.....	9
1.4.3. Punktmutationen als Ursache von SCA.....	10
1.5. Spinocerebelläre Ataxie Typ 13 .....	14
1.5.1. Varianten/Mutationen in <i>KCNC3</i> .....	14
1.5.2. Klinische Charakteristika der SCA13 .....	16
1.6. <i>KCNC3</i> -Gen.....	18
1.7. Aufgabenstellung.....	22
2. Materialien .....	23
2.1. Chemikalien.....	23
2.2. Computerprogramme.....	23
2.3. Enzyme und Nukleotide .....	23
2.4. Geräte.....	23
2.5. Kits.....	25
2.6. Lösungen und Puffer .....	25
2.7. Verbrauchsmaterialien.....	26
3. Methoden.....	27
3.1. DNA-Extraktion .....	27
3.1.1. Grundlagen.....	27
3.1.2. Durchführung.....	27
3.1.3. Extraktion von NucleoSpin Blood Kit.....	28
3.2. Quantifizierung der DNA .....	28
3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	29
3.3.1. Grundlagen.....	29

3.3.2. Durchführung der <i>KCNC3</i> -PCR .....	31
3.3.3. Aufreinigung .....	32
3.3.4. Exo-SAP .....	32
3.4. Agarosegelelektrophorese .....	33
3.4.1. Grundlagen.....	33
3.4.2. Durchführung.....	33
3.4.3. Auswertung .....	33
3.5. Sequenzierung .....	34
3.5.1. Grundlagen.....	34
3.5.2. Durchführung.....	35
3.5.3. Reinigung der Sequenzierungsansätze.....	35
3.5.4. Auswertung der Sequenzdaten.....	35
4. Ergebnisse .....	36
4.1. Patientenkollektiv .....	36
4.2. Veränderungen der Sequenzabfolge.....	37
4.2.1. Exon 1 .....	38
4.2.2. Exon 2 .....	41
4.2.3. Exon 3 .....	45
4.2.4. Exon 4 .....	47
5. Diskussion .....	48
5.1. Häufigkeit der SCA13 .....	48
5.2. Genetik der SCA13.....	49
5.2.1. Identifizierte Polymorphismen im <i>KCNC3</i> -Gen.....	49
5.2.2. Identifizierte potentielle Mutation im <i>KCNC3</i> -Gen .....	50
5.2.3. Auswirkungen von Aminosäure-Substitutionen in <i>KCNC3</i> und <i>KCND3</i> ....	52
5.2.4. Auswirkung von Mutationen im 5' untranslatierten Bereich .....	53
5.3. Empfehlung zur molekulargenetischen Testung auf SCA13 .....	54
5.4. Ausblick und kritische Wertung.....	55
6. Zusammenfassung.....	57
7. Summary .....	58
8. Abkürzungsverzeichnis .....	59
9. Abbildungsverzeichnis .....	62
10. Tabellenverzeichnis.....	63
11. Literaturverzeichnis.....	64
12. Erklärung zur Dissertation .....	74
13. Danksagung.....	75

### **1. Einleitung**

Der Begriff Ataxie bedeutet im Griechischen „Unordnung“. In der Medizin wird Ataxie als Oberbegriff für Störungen der Koordination bei Bewegungsausführungen verwendet. Unterschieden wird die vom Kleinhirn ausgehende cerebelläre Ataxie von der peripheren, sensiblen Ataxie, die die propriozeptiven Bahnen betrifft. Typische Ataxieformen sind Rumpfataxie, Standataxie, Gangataxie und Zeigeataxie. Bei einer Rumpfataxie ist der Patient unfähig, seinen Rumpf zu stabilisieren und hat bereits im Sitzen eine Fallneigung. Bei der Standataxie besteht eine Gleichgewichtsstörung im Stehen, die anhand des Romberg-Stehversuchs detektiert werden kann. Für die Gangataxie ist ein breitbeiniges, unsicheres Gangbild charakteristisch, sodass der sogenannte Seiltänzerengang nicht mehr durchgeführt werden kann (Hacke, 2010). Eine Dysmetrie (Zielunsicherheit) kann beispielsweise durch den Finger-Nase-Versuch untersucht werden. Weitere Symptome der cerebellären Ataxie sind Störungen der Augenbewegungen (Nystagmus), des Sprechens (Dysarthrie), der Ausführung von schnellen, antagonistischen Bewegungen (Dysdiadochokinese), sowie ein (Intensions-) Tremor (Bösch, 2007).

### **1.1. Klassifikation der Ataxien**

Die Einteilung der verschiedenen Ataxien befindet sich im ständigen Fluss. Ursprünglich wurden die Krankheitsbilder in Anlehnung an ihren jeweiligen Erstbeschreiber benannt. Dadurch kam es jedoch zu Überschneidungen von Symptomen und Krankheiten. Holmes (1907) und Greenfield (1954) entwickelten auf der Grundlage von neuropathologischen Veränderungen eine neue Klassifikation in spinale bzw. spinocerebelläre Degenerationen, rein cerebelläre Atrophien (CA), olivoponto- cerebelläre Atrophien (OPCA) und dentatorubrale Atrophien (DRPLA). Im klinischen Alltag erwies sich diese Einteilung als wenig nützlich, da sowohl die Ursache, sowie das Krankheitsbild und der Verlauf nicht berücksichtigt wurden. Die darauffolgende Einteilung von Harding (1982/83) berücksichtigte die Klinik und den Erbgang. Heute werden Ataxien in hereditäre und sporadische Ataxien eingeteilt (Hennerici und Bänzner, 2001; Rentschler, 2010).

### **1.2. Sporadische Ataxien**

Die sporadisch cerebellären Ataxien lassen sich unterteilen in symptomatisch und idiopathisch (Hennerici und Bänzner, 2001; Brusse et al., 2007; Rentschler, 2010).

### 1.2.1. Symptomatische Ataxien

Eine der häufigsten Ursachen für eine symptomatische Ataxie ist Alkoholismus. Im Gegensatz zu der reversiblen cerebellären Ataxie nach akuter Alkoholintoxikation, kann es beim chronischen Alkoholmissbrauch durch eine Kleinhirnatrophie zur manifesten Ataxie kommen. Im Vordergrund stehen die Gang- und Standataxie. Dysarthrie und okulomotorischen Störungen können ebenfalls auftreten. Die Symptome können auch durch toxische Substanzen wie Lithium, Schwermetalle und Lösungsmittel oder durch Überdosierung von Pharmaka wie Antiepileptika, Barbiturate oder Benzodiazepine auftreten. Weitere Auslöser für Ataxien sind paraneoplastische Kleinhirndegenerationen, beispielsweise hervorgerufen durch ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom und seltener durch ein Mammakarzinom oder einen Morbus Hodgkin. In etwa 50 % der Fälle sind Antikörper wie anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri oder anti-Tr nachweisbar. Malabsorptionssyndrome mit Folgen wie Vitamin E- oder Vitamin B12-Mangel können genauso wie metabolische Ursachen z.B. auf Grund einer Hypothyreose zu Ataxien führen. Zudem gibt es entzündliche und immunvermittelte Ataxien. Auslöser sind hier Erkrankungen wie die cerebelläre Enzephalitis als Komplikation einer viralen Erkrankung und chronische antikörperassoziierte Erkrankungen. Weiterhin gibt es physikalisch bedingte Ataxien. Ein Hitzeschlag oder eine Sepsis können zu erhöhter Körpertemperatur bis über 40°C führen, wodurch hitzelabile Zellen wie die Purkinjezellen zerstört werden können (Stoll, 1998; Abele, 2002; Ceballos-Baumann und Conrad, 2005; Brusse et al., 2007).

### 1.2.2. Idiopathische Ataxien

Die häufigste Ursache für idiopathische Ataxien ist die Multisystematrophie (MSA). Die Prävalenz liegt bei 1,9-4,9 pro 100.000 (Brusse et al., 2007). Der Beginn der Erkrankung liegt durchschnittlich in der sechsten Lebensdekade. Kennzeichnend ist ein raschprogredienter Verlauf mit einer Überlebenszeit von sechs bis neun Jahren. Es werden zwei Verlaufsformen unterschieden: Bei der MSA-P kommt es v.a. zu Parkinsonsymptomen wie Bradykinesie, Rigor und Tremor, bei der MSA-C dagegen zu cerebellären Zeichen wie Gang-, Extremitätenataxie und Nystagmus.

Zudem treten Symptome wie Urininkontinenz, Erektionsstörung, Sprech- und Schluckstörungen, Obstipation, orthostatische Hypotension, positiver Babinski-Reflex und Schlafstörungen auf. Im MRT können eine olivopontocerebelläre Atrophie, sowie

eine Atrophie des Putamens erkennbar sein. Bei der MSA sind oligodendrogliale Einschlusskörper mit  $\alpha$ -Synuclein nachweisbar, wodurch die Erkrankung sowie der Morbus Parkinson und die Lewy-Körper-Demenz zu den  $\alpha$ -Synucleinopathien zählt. Ausschlusskriterien für eine MSA sind eine positive Familienanamnese, ein Beginn der Symptome vor dem 30. Lebensjahr und endokrine oder mentale Störungen. Eine kausale Therapie für MSA ist nicht bekannt (Wüllner und Klockgether, 2003; Wenning et al., 2004; Brusse et al., 2007).

### **1.3. Hereditäre Ataxien**

Die erblichen Ataxien werden als Heredoataxien bezeichnet und nach ihrem Erbgang in autosomal dominant, autosomal rezessiv, X-chromosomal und mitochondrial eingeteilt.

#### **1.3.1. Mitochondriale Ataxien**

Mitochondriopathien, denen Defekte in der mitochondrialen DNA zugrunde liegen, werden maternal vererbt. Es handelt sich meist um Multisystemerkrankungen, bei denen eine Ataxie eine Rolle spielt, jedoch selten zu den Leitsymptomen gehört. Die häufigsten mitochondrialen Erkrankungen mit Ataxie umfassen:

- Chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO):

Die häufigste Ursache ist eine mtDNA Punktmutation an Position 3243A>G (Finsterer, 2004; Kornblum, 2012). Zu den Leitsymptomen gehört eine meist beidseitige Ptosis und eine progrediente Lähmung der äußeren Augenmuskeln. Bei der CPEOplus kommen Symptome wie Kardiomyopathien, Neuropathien, Ataxien und endokrine Störungen, wie Diabetes mellitus, hinzu. In seltenen Fällen kann es zu einem Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) kommen, für welches eine Pigmentdegeneration der Retina typisch ist (Kornblum, 2012).

- Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden (MELAS):

Sehstörungen gehören meist zu den ersten sichtbaren Anzeichen der schlaganfallähnlichen Episoden, mit denen häufig migräneartige Kopfschmerzen mit Erbrechen und epileptische Anfälle vergesellschaftet sind. Zudem können weitere Symptome ähnlich den CPEO-Symptomen auftreten (Kornblum, 2012).



- Myoklonusepilepsie mit Ragged Red Fasern (MERRF):

Häufig treten neben fokalen und generalisierten Myoklonusepilepsien Symptome wie cerebelläre Ataxie, Demenz, Optikusatrophie und Taubheit auf (Finsterer, 2004). Im Schädel-CT sind meist cerebelläre Atrophien sichtbar (Kornblum, 2012).

- Hereditäre Leber-Optikus-Neuropathie (LHON):

Einseitige und später beidseitige Visusminderung, die häufiger bei Männern auftritt. Weitere Symptome wie Ataxie, Tremor und Dystonie können auftreten (Kornblum, 2012).

- Ataxie des Erwachsenenalters (*MTATP6*-assoziiert):

Mutationen im *MTATP6* rufen typischerweise neurologische Multisystemerkrankungen hervor wie im Kindesalter das Leigh-Syndrom (subakut nekrotisierende Enzephalomyelopathie) oder im frühen Erwachsenenalter Neuropathie, Ataxie und Pigmentdegeneration der Netzhaut (NARP). Es wurden Patienten mit Beginn der Erkrankung im Erwachsenenalter beschrieben, die klinisch nicht von einer spinocerebellären Ataxie zu unterscheiden waren (Pfeffer et al., 2012).

Zu den selten mitochondrialen Erkrankungen mit Ataxie gehören unter anderem die mitochondriale neurogastrointestinale Enzephalomyopathie (MNGIE), die mitochondrialen DNA-Depletionssyndrome (MDS) und die Coenzym-Q10-Defizienz (Kornblum, 2012).

### 1.3.2. X-chromosomale Ataxien

Das Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS) gehört zu den Trinukleotid-Repeat-Erkrankungen. Träger von weniger als 45 CGG-Wiederholungen sind gesund. 45 bis 54 Wiederholungen stellen eine Grauzone dar. Bei männlichen Genträgern mit einem prämutierten *FMRI*-Gen (55-200 CGG-Wiederholungen) kommt es in etwa 40 % der Fälle zu einer spätmanifestierten neurodegenerativen Störung, dem FXTAS. Bei weiblichen Trägerinnen einer Prämutation findet sich dagegen nur bei etwa 8-16 % ein FXTAS (Saldarriaga et al., 2014; Brown und Stanfield, 2015) im fortgeschrittenen Alter. 80 % der Patienten/innen mit einem FXTAS zeigen eine Gangataxie und/oder einen Intensionstremor, zudem können Demenz, Parkinsonismus, psychiatrische Störungen und autonome Dysfunktion auftreten. Frauen mit einer Prämutation weisen ein erhöhtes

Risiko für eine prämatüre Ovarialinsuffizienz auf (Steinbach und Gläser, 2009).

### 1.3.3. Autosomale Rezessive Ataxien

Die Friedreich Ataxie (FRDA) ist mit einer Prävalenz von 1-2:50.000 die häufigste, rezessiv vererbte Ataxie des Kindesalters. Typisch für die FRDA ist eine langsam progrediente Ataxie mit Beginn vor dem 25. Lebensjahr und weiteren Symptomen wie Dysarthrie, Sensibilitätsstörungen, Verlust der tiefen Sehnenreflexe und der Pyramidenbahnzeichen. In vielen Fällen sind zudem folgende Begleiterkrankungen vorzufinden: Skoliose, Optikusatrophy, Diabetes mellitus und Kardiomyopathie. Die Herzerkrankung ist dabei die häufigste Todesursache. Patienten mit einem Krankheitsbeginn nach dem 25. Lebensjahr weisen einen milderen und langsameren Verlauf auf, da zumeist keine Kardiomyopathie auftritt. FRDA wird häufig durch eine Verlängerung eines intronisch gelegenen GAA-Repeats im *FRDA1*-Gen verursacht. Das *FRDA1*-Gen codiert für das in den Mitochondrien gelegene Protein Frataxin (Brusse et al., 2007; Jayadev und Bird, 2013; Muthuswamy und Agarwal, 2015).

Die Ataxie Teleangiektasie (AT), auch Louis-Bar-Syndrom genannt, wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt, ist aber mit 1:100.000 deutlich seltener. AT ist durch eine progressiv cerebelläre Ataxie und sichtbare Dilatationen oberflächlichere Blutgefäße gekennzeichnet. Hinzu kommen okulomotorische Bewegungsstörungen, Chromosomeninstabilität, Choreoathetose, Immundefizienz mit vermehrten Atemwegsinfekten und ein erhöhtes Risiko für maligne Tumoren wie Leukämien und Lymphome. Alpha-Fetoprotein im Serum ist erhöht. Hervorgerufen wird AT durch eine Mutation im *ATM*-Gen, welches eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt. Der Beginn der AT liegt im frühem Kindesalter. Bereits im jungen Jugendalter sind die Betroffenen an einen Rollstuhl gebunden und sterben meist zwischen 20 und 30 Jahren (Chun und Gatti, 2004; Jayadev und Bird, 2013; Liu et al., 2016).

Weiterhin gehören zu den autosomal rezessiven Erkrankungen mit Ataxie die Ataxie mit isoliertem Vitamin-E-Defizit (AVED), die Ataxien mit okulomotorischer Apraxie Typ 1 und 2 (AOA1 und 2) und die autosomal rezessiv spinocerebellären Ataxien (Jayadev und Bird, 2013). Seit ein paar Jahren werden die autosomal rezessiv vererbten Ataxien ähnlich der SCAs in autosomal rezessive spinocerebelläre Ataxien eingeteilt. SCAR1 wird dabei synonym zu der AOA2 verwendet. Durch Mutationen im *Senataxin* Gen kommt es zu einer früh einsetzenden cerebellären Ataxie (Ichikawa et al., 2013). Ein weiteres Beispiel

für SCARs ist die SCAR8, die auch als autosomal rezessiv cerebelläre Ataxie Typ 1 (ARCA1) bezeichnet wird und mit einer späten, langsam progredienten Ataxie einhergeht (Gros-Louis et al., 2007; Izumi et al., 2013).

### 1.3.4. Autosomal Dominate Ataxien (ADCA)

Anita Harding teilte die autosomal dominant cerebellären Ataxien (ADCA) nach ihrem klinischen Phänotyp in drei Gruppen ein. Alle drei Typen beinhalten die Leitsymptome Ataxie, Dysarthrie und Nystagmus.

ADCA-Typ I: Dieser stellt durch ein breites Spektrum an klinischen und genetischen Subtypen die größte Gruppe dar. Neben den cerebellären Symptomen treten auch nicht-cerebelläre Symptome wie Augenmuskellähmung, Optikusatrophie, Muskelatrophie, Gefühlsstörung und Pyramidenbahnzeichen auf. Selten sind parkinsonähnliche Symptome (Akinese, Rigor), Blasenfunktionsstörung und Demenz. Zu dieser Gruppe zählen unter anderem SCA1- SCA4, SCA12, SCA17 und DRPLA.

ADCA-Typ II: Charakteristisch ist eine pigmentäre Retinadegeneration, die bis zur Erblindung führen kann. SCA7 ist aktuell der einzige Vertreter der Gruppe.

ADCA-Typ III: Typisch sind rein cerebelläre Symptome, die das Kleinhirn betreffen. Die Prognose ist laut Fujioka und Kollegen besser als die des ADCA-Typ I. Vertreter dieses Typs sind z.B. SCA5, SCA6, SCA11 und SCA26.

Die Zuordnung ist durch die selbst innerhalb einer betroffenen Familie sehr vielfältigen Symptome und verschiedenen Krankheitsverläufe häufig schwierig (Stevanin et al., 2000; Schöls et al., 2004; Whaley et al., 2011; Fujioka et al., 2013; Jayadev und Bird, 2013).

Zu den autosomal dominanten Ataxien gehören die spinocerebellären Ataxien, die episodischen Ataxien (EA) und die dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie (DRPLA). Die spinocerebellären Ataxien werden in einem eigenen Kapitel ausführlich besprochen.

Zu den EA zählen sechs Formen, wobei EA1 und EA2 die häufigsten sind. EA1 wird hervorgerufen durch Punktmutationen im *KCNA1*-Gen, das für eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals codiert. Kennzeichnend ist ein früher Krankheitsbeginn mit bewegungsinduzierten, meist unter 15 Minuten anhaltenden und bis zu 15 mal pro Tag auftretenden, ataktischen Attacken sowie Myokymien des Gesichts, der Arme und Beine zwischen den Anfällen (D'Adamo et al., 2015). Durch eine Mutation im *CACNA1A*-Gen des Calciumkanals kommt es zur EA2. Meist ab der fünften

Lebensdekade treten Stunden bis Wochen anhaltende, bewegungsunabhängige Attacken auf, die häufig von migräneartigen Kopfschmerzen, (Hemi-) Paresen und Übelkeit begleitet werden (Brusse et al., 2007).

Eine CAG-Expansion im *Atrophin-1*-Gen führt zur DRPLA. In Europa tritt sie deutlich seltener als in Japan auf. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen korreliert mit dem Beginn der Erkrankung. Bei über 65 CAG-Wiederholungen kommt es zu einer Myoklonusepilepsie vor dem 20. Lebensjahr. Zudem treten Symptome wie Ataxie, Choreoathetose und Demenz auf (Schöls et al., 2004).

### **1.4. Spinocerebelläre Ataxien**

Spinocerebelläre Ataxien sind neurodegenerative Erkrankungen, die zu den autosomal dominanten cerebellären Ataxien (ADCAs) gehören. Die Prävalenz für SCA liegt zwischen 0-5,6/100.000 Einwohnern (van de Warrenburg et al., 2002; Ruano et al., 2014).

Zu den für SCA charakteristischen Symptomen gehören unkoordinierte Bewegungsabläufe (Ataxie), Augenbewegungsstörungen (Blickrichtungsnystagmus) und Sprechstörungen (Dysarthrie). Zudem können, wie bereits oben beschrieben, verschiedene andere neurologische Symptome auftreten. Zurzeit sind 41 genetische Subtypen bekannt (Bird, 2016). Von 36 Subtypen wurden der Genlocus und der zugrundeliegende Mutationsmechanismus identifiziert. Eine Übersicht über die Subtypen ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten SCA-Typen

SCA	Gen/ Genprodukt	Chromosomale Lokalisation	Repeat-Sequenz, Mutationsmechanismus
1	<i>ATXN1</i> / Ataxin 1	6p22	CAG
2	<i>ATXN2</i> / Ataxin 2	12q24	CAG
3	<i>ATXN3</i> / Ataxin 3	14q24.3-q.31	CAG
4	unbekannt	16q22.1	unbekannt
5	<i>SPTBN2</i>	11p11-q11	Deletion, Punktmutation
6	<i>CACNA1A</i>	19q13	CAG
7	<i>ATXN7</i> / Ataxin 7	3p21.1-p12	CAG
8	<i>ATXN8OS</i> / Ataxin 8	13q21	CTG
10	<i>ATXN10</i> / Ataxin 10	22q13	ATTCT
11	<i>TTBK2</i>	15q14-q21.3	Deletion, Insertion

## 1. Einleitung

12	<i>PPP2R2B</i>	5q31-q33	CAG
13	<i>KCNC3</i>	19q13.3-q13.4	Punktmutation
14	<i>PRKCG</i>	19q13.4	Punktmutation
15/16	<i>ITPR1</i>	3q26.1	Punktmutation, große Deletion
17	<i>TBP</i>	6q27	CAG
18	unbekannt	7q22-q32	unbekannt
19/22	<i>KCND3</i>	1q21	Punktmutation, Deletion
20	<i>DAGLA</i>	11q12	Große Duplikation
21	<i>TMEM240</i>	7p21-p15.1	Punktmutation
23	<i>PDYN</i>	20q13	Punktmutation
25	unbekannt	2p21-q13	unbekannt
26	<i>EEF2</i>	19p13.3	Punktmutation
27	<i>FGF14</i>	13q34	Punktmutation
28	<i>AFG3L2</i>	18p11.22-q11.2	Punktmutation
29	<i>ITPR1</i>	3p26	Punktmutation
30	unbekannt	4q34.3-q35.1	unbekannt
31	<i>BEAN1</i>	16q21	TGGAA
32	unbekannt	7q32-q33	unbekannt
34	<i>ELOVL4</i>	6p12.3-q16.2	Punktmutation
35	<i>TGM6</i>	20p13	Punktmutation
36	<i>NOP56</i>	20p13	GGCCTG
37	<i>DAB1</i>	1p32	ATTTC
38	<i>ELOVL5</i>	6p12.1	Punktmutation
40	<i>CCDC88C</i>	14q32.11-q32.12	Punktmutation
41	<i>TRPC3</i>	4q27	Punktmutation
42	<i>CACNAIG</i>	17q21.33	Punktmutation
43	<i>MME</i>	3q25.2	Punktmutation
44	<i>GRM1</i>	6q24.3	Punktmutation
45	<i>FAT2</i>	5q33.1	Punktmutation
46	<i>PLD3</i>	19q13.2	Punktmutation
47	<i>PUM1</i>	1q35.2	Punktmutation

(Schöls et al., 2004; Durr, 2010; Whaley et al., 2011; Fujioka et al., 2013; Jayadev und Bird, 2013; Bird, 2016; OMIM Phenotypic Series-PS164400).

Die zugrundeliegenden Mutationen sind Repeat-Expansionen im codierenden oder im nicht-codierenden Bereich und Punktmutationen, sowie Deletionen, die Bereiche von 100 kb und mehr umfassen können und Duplikationen.

### **1.4.1. CAG-Repeat-Expansion im codierenden Bereich**

Zu den am häufigsten vorkommenden SCA-Subtypen gehören SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6, die zusammen über 50 % der Fälle ausmachen sowie SCA7 und SCA17. Ursache sind CAG-Repeat-Expansionen im codierenden Bereich (Jacobi et al., 2015). Vermehrte CAG-Wiederholungen führen zu verlängerten Polyglutamin-Abfolgen in unterschiedlichen Proteinen. Trinukleotid-Expansionen sind genetisch instabil und werden häufig an die nächste Generation verlängert weitergegeben. Die Erkrankung tritt bei Nachkommen früher oder schwerer auf. Dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet (Stevanin et al., 2000; Durr, 2010; Bird, 2016). Verursachend für die SCAs ist neben anderen neuropathologischen Veränderungen der Verlust von Purkinjezellen. Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Klinik als auch ihres neuropathologischen Profils. So weist SCA1 den größten Gesamtzellverlust und SCA6 den größten Verlust an Purkinjezellen auf (Stevanin et al., 2000). Bei der meist im 5. Lebensjahrzehnt beginnenden SCA2 findet man langsame Sakkaden, Hyporeflexie, Tremor oder selten Ophthalmoplegie oder Parkinsonismus (Schöls et al., 2004; Pulst, 2015). Der weltweit am häufigsten vorkommende Typ SCA3, auch Machado-Joseph-Krankheit genannt, wird aufgrund seiner klinischen Vielfalt in verschiedene Typen I-IV eingeteilt. Bezeichnend für SCA7 ist das Auftreten einer Ataxie mit einer pigmentären Makuladegeneration, die bis zur Erblindung führen kann (Garden, 1993; Schöls et al., 2004).

### **1.4.2. Repeat-Expansion im nicht-codierenden Bereich**

Zu den Repeat-Expansionen im nicht-codierenden Bereich gehören SCA8, SCA10, SCA12, SCA31 und SCA36. Bei der durch eine CTG-Repeat-Expansion im nicht-codierenden Bereich hervorgerufenen SCA8 findet man eine größere Instabilität und somit eine größere Zunahme der Wiederholungen bei maternaler Transmission (Stevanin et al., 2000). Neben den charakteristischen Symptomen einer SCA leiden Patienten unter Tremor und vermindertem Vibrationsempfinden. Das Fortschreiten der Erkrankung ist meist langsam (Ayhan et al., 1993; Schöls et al., 2004). Die durch eine intronische ATTCT-Wiederholung im *ATXN10*-Gen hervorgerufene SCA10 zeigt eine langsam

fortschreitende cerebelläre Ataxie, die mit einer leichten Gleichgewichtsstörung und einem schwankenden Gangbild beginnt. Weitere Symptome sind Dysarthrie, Nystagmus, Polyneuropathie und Epilepsie (Matsuura und Ashizawa, 1993; Durr, 2010). SCA12 wird vor allem in Indien nachgewiesen. Sie wird durch eine CAG-Repeat-Expansion im nicht-codierenden Bereich des *Proteinphosphatase-2-regulatory-subunit-B (PPP2R2B)*-Gens hervorgerufen und tritt meist im 5. Lebensjahrzehnt mit einem Tremor vor allem der Arme und des Kopfes, einer leichten Ataxie, Nystagmus und Hyperreflexie auf. Zum Teil wurden zudem eine Verlangsamung der Willkürmotorik (Bradykinese) und eine leichte Demenz festgestellt (Margolis et al., 1993; Durr, 2010). Durch eine TGGAA-Repeat-Expansion im 5'UTR-Bereich wird SCA31 hervorgerufen. Sie wurde vermehrt in Japan diagnostiziert. Kennzeichnend ist ein später Krankheitsbeginn um das 60. Lebensjahr mit einer leichten Ataxie (Sakai et al., 2010). SCA36 wird durch eine Verlängerung eines intronisch gelegenen GGCCTG-Repeat im *NOP56*-Gen verursacht. Die Erkrankung manifestiert sich zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Ein charakteristisches Symptom ist eine Schallempfindungsschwerhörigkeit (Arias et al., 1993).

### 1.4.3. Punktmutationen als Ursache von SCA

In den letzten Jahren wurden zunehmend Punktmutationen als Ursache einer SCA identifiziert. Zu ihnen gehören SCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA15/16, SCA19-23, SCA26-29, SCA34, SCA35, SCA38 und SCA40-47. Diese SCA-Typen sind deutlich seltener als jene, denen ein Trinukleotid-Expansionsmechanismus zugrunde liegt.

Exemplarisch werden hier einige Ataxien mit zugrundeliegenden Punktmutationen und Deletionen beschrieben. In einer von den Großeltern von Präsident Abraham Lincoln abstammenden amerikanischen Familie konnte 1994 eine Punktmutation im *SPTBN2*-Gen, welches für  $\beta$ -III-Spektrin codiert, SCA5 zugeordnet werden (Lincoln-Ataxie). SCA5 ist durch eine Atrophie des Kleinhirns und eine Ataxie gekennzeichnet (Ikeda et al., 2006; Durr, 2010; Avery et al., 2016). Bis heute konnte in vier Familien die durch Deletion und Punktmutation hervorgerufene SCA11 diagnostiziert werden. SCA11 äußert sich mit einer langsam fortschreitenden Ataxie mit Gleichgewichtsstörung, pathologischen Augenbewegungen, Dysarthrie und selten Hyperreflexie. In einer britischen Familie wurde ein großer Verlust an Purkinjezellen und pathologische Tau-Veränderungen in den Basalganglien, dem Mittelhirn und der Medulla festgestellt (Houlden, 1993; Durr, 2010). Verursachend für SCA14 ist eine Punktmutation im

*PRKCG*-Gen. Neben den typischen SCA-Symptomen mit einer langsam fortschreitenden Ataxie ist SCA14 durch einen haltungsbedingten Tremor, Muskelzuckungen, Hyperreflexie, fokale Dystonie, parkinsonähnliche Symptome und kognitive Defizite charakterisiert (Durr, 2010; Chen et al., 2013a). SCA15 und SCA16 liegt der gleiche Mechanismus zugrunde: Große Deletionen im *ITPR1*-Gen sind krankheitsverursachend. SCA15/16 ist durch eine sehr langsam fortschreitende Ataxie mit Tremor, Nystagmus und leichter Hyperreflexie gekennzeichnet (Pagon et al., 1993; Bird, 2016). Bei SCA29 findet man Punkt-Mutationen im *ITPR1*-Gen. Interessanterweise zeigen SCA29-Patienten kognitive Beeinträchtigungen (Shadrina et al., 2016). In einer australischen Familie anglo-keltischen Ursprungs fand man (Knight, 2004; Knight et al., 2008) eine 260 kb Duplikation in der zuvor für SCA20 beschriebenen Region. Patienten mit SCA20 zeigen initial eine früh einsetzende Dysarthrie. Daneben kann ein Tremor des Gaumensegels, spasmodische Dysphonie und Hyperreflexie auftreten (Durr, 2010; Storey, 2012). SCA19 und SCA22 zeigen signifikante Überlappungen und werden durch Mutationen im *KCND3*-Gen hervorgerufen. Zu den Symptomen gehören eine milde, langsam fortschreitende Ataxie, Myoklonus, kognitive Beeinträchtigung, periphere Neuropathie, Tremor, Pyramidenbahnzeichen und eine leichte Atrophie des Kleinhirns (Duarri et al., 2012; Lee et al., 2012). SCA21 beschreibt eine früh einsetzende, langsam progrediente Ataxie in Kombination mit schwerer kognitiver Beeinträchtigung und mentaler Retardierung (Delplanque et al., 2014). Bei SCA23 treten neben der cerebellären Ataxie Dysarthrie, sowie Störungen der Augenbewegungen und des Vibrationsempfindens auf (Bakalkin et al., 2012; Bird, 2016). Eine Mutation im Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14 (*FGF14*-Gen) ist für SCA27 verantwortlich und geht mit einem in der Kindheit einsetzenden Tremor, langsam progredienter Ataxie, leichter Kleinhirnatrophie, niedrigem IQ, Gedächtnisschwierigkeiten und kognitiven Beschwerden einher (Durr, 2010). Bei SCA28 liegen Mutationen im *AFG3L2*-Gen vor. In der Regel handelt es sich um eine langsam fortschreitende cerebelläre Ataxie in Kombination mit Dysarthrie, Hyperreflexie in der unteren Extremität, Nystagmus, Ophthalmoplegie und Ptosis (Brussino et al., 1993; Durr, 2010).

Die Häufigkeit der verschiedenen Subtypen ist je nach geografischer Lage sehr unterschiedlich. Dies ist auf Gründereffekte zurückzuführen (Klockgether, 2008). So findet man z.B. auf Kuba vor allem SCA2 und in Portugal vermehrt SCA3. Weltweit stellt SCA3 mit 20-25 % die größte Gruppe da (Finsterer, 2009). Gefolgt von den Subtypen



## 1. Einleitung

SCA1, SCA2 und SCA6. In den nachfolgenden Abbildungen sind Verteilungen der SCA-Subtypen weltweit und in einzelnen Ländern dargestellt.

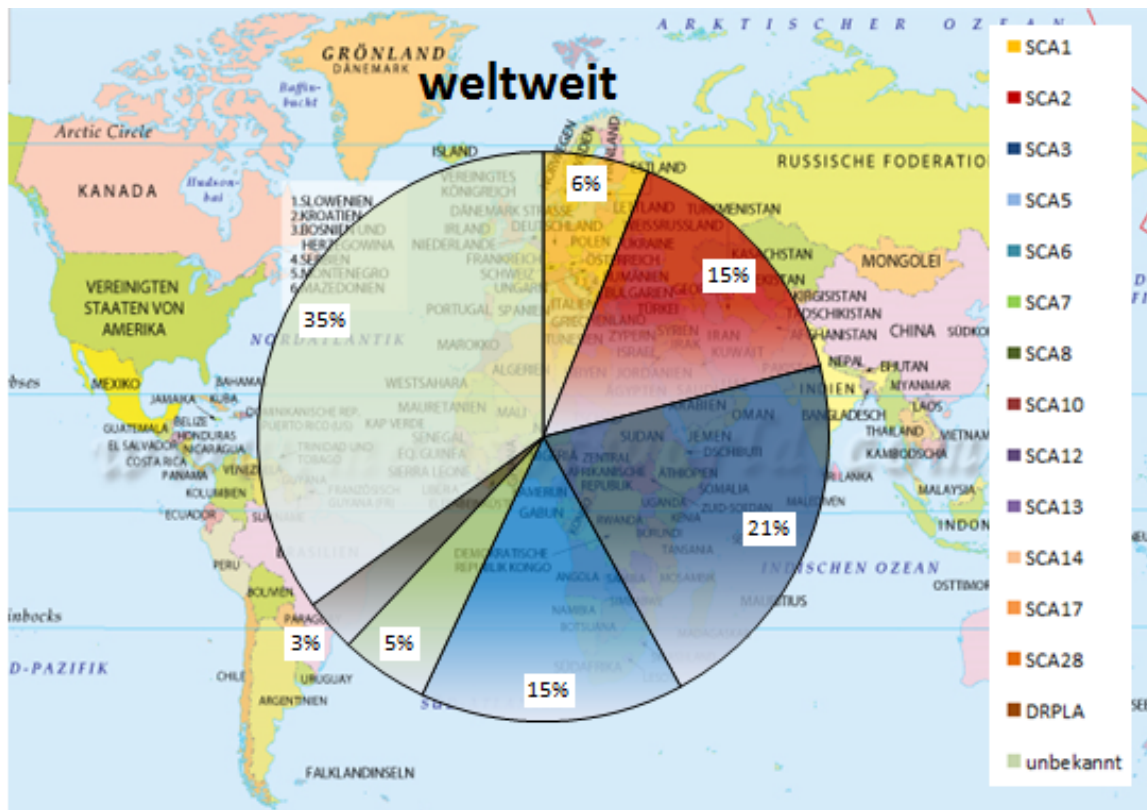
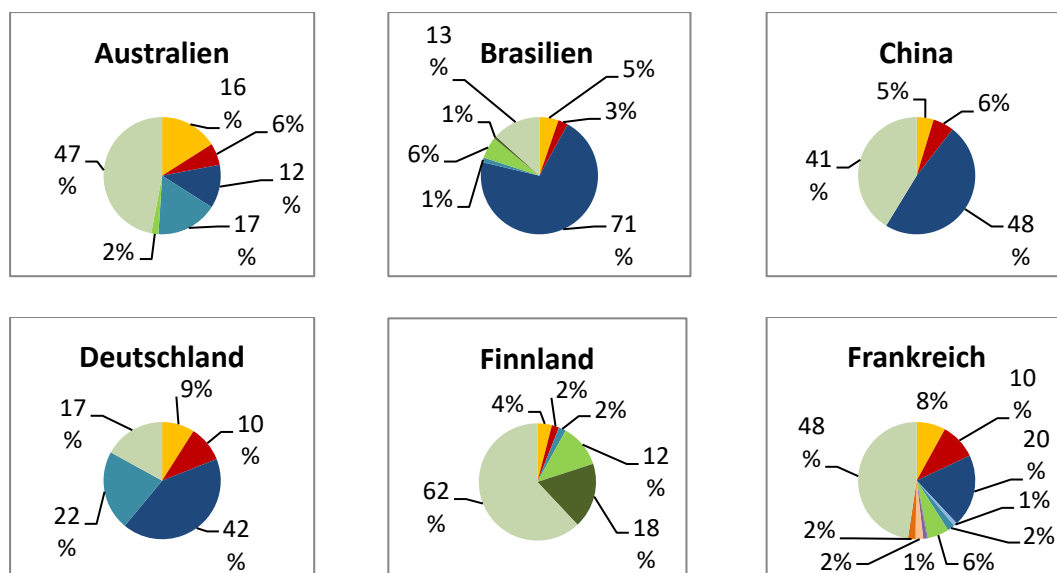
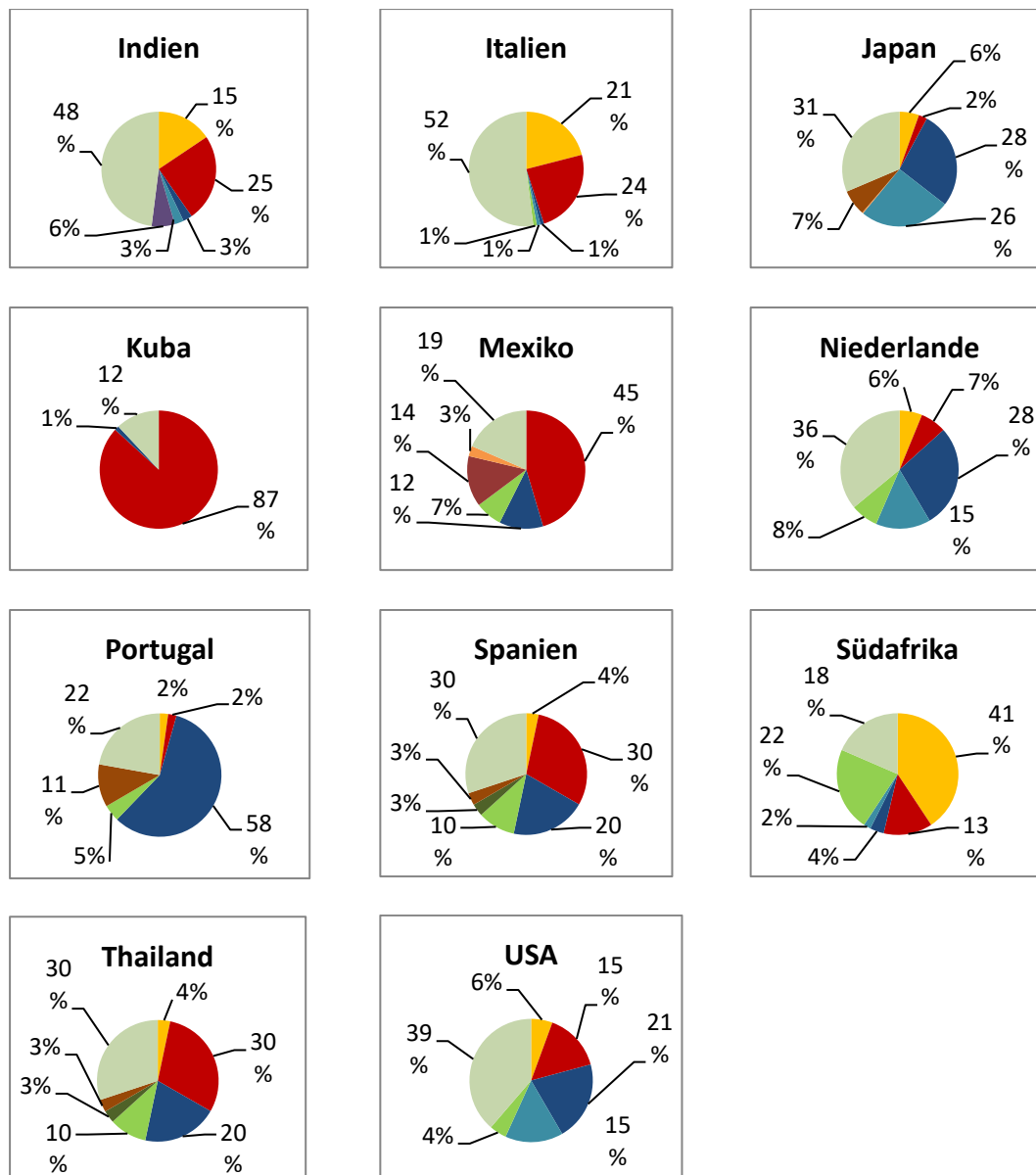


Abbildung 1: Häufigkeiten der SCA-Typen weltweit (Grafik nach Schöls et al., 2004; Weltkarte nach [www.mapsofworld.com](http://www.mapsofworld.com))





Legende:

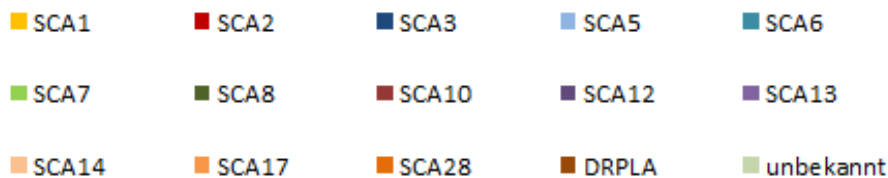


Abbildung 2: Weltweites Auftreten der SCA-Subtypen (Moseley et al., 1998; Storey et al., 2000; Tang et al., 2000; Srivastava et al., 2001; Velazquez-Perez et al., 2001; Maruyama et al., 2002; van de Warrenburg et al., 2002; Bryer et al., 2003; Brusco et al., 2004; Schöls et al., 2004; Infante et al., 2005; Juvonen et al., 2005; Alonso et al., 2007; Durr, 2010; Vale et al., 2010; Boonkongchuen et al., 2014; Cintra et al., 2014; Bird, 2016).

### **1.5. Spinocerebelläre Ataxie Typ 13**

Im Jahr 2000 beschrieben Herman-Bert und Kollegen bei Mitgliedern einer französischen Ataxie-Familie einen neuen Genlokus auf Chromosom 19q13.3-q13.4, in einem ungefähr 8-cM Intervall zwischen den Markern D19S219 und D19S552. Der neue Locus spricht für einen neuen Phänotyp der ADCAs mit geistiger Retardierung und wurde als SCA13 bezeichnet (Herman-Bert et al., 2000).

2005 kartierten Waters und Kollegen in einer philippinischen Ataxie-Familie einen neuen Ataxie-Locus in einer 4-cM Region auf dem Chromosom 19q13 (LOD-Score 3,89) (Waters et al., 2005). Dieser Locus ist überlappend mit dem von Herman-Bert beschriebenen. Die untersuchten Patienten zeigen hier jedoch klinisch ein unterschiedliches Krankheitsbild.

Seit 2006 ist bekannt, dass SCA13 durch Mutationen (Tabelle 2) im *KCNC3*-Gen hervorgerufen wird, das in 19q13 lokalisiert ist (Waters et al., 2006). *KCNC3* codiert für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal.

#### **1.5.1. Varianten/Mutationen in *KCNC3***

In der Folgezeit wurden weitere Varianten und Mutationen identifiziert, die hier zusammengefasst werden.

Figuroa konnte 2010 in zwei Familien eine weitere Mutation im *KCNC3*-Gen nachweisen, bei der es sich um eine Substitution von Arginin durch Histidin an der AS-Position 423 (p.Arg423His) handelt (Figuroa et al., 2010). Duarri und Kollegen diagnostizierten 2015 diese Mutation bei einem niederländischen Ataxiepatienten. In diesem Fall handelte es sich wahrscheinlich um eine neu aufgetretene Mutation.

Tabelle 2: Maligne Mutationen im *KCNC3*-Gen

Referenz- sequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Mutations- bezeichnung	Autor
rs104894700	Exon 2	c.1344C>A	p.Phe448Leu	F448L	(Herman- Bert et al., 2000)
rs104894699	Exon 2	c.1259G>A	p.Arg420His	R420H	(Waters et al., 2005)
rs797044872	Exon 2	c.1268G>A	p.Arg423His	R423H	(Figuerola et al., 2010)
rs879253883	Exon 2	c.1283C>T	p.Thr428Ile	T428I	(Parolin Schnek- enberg et al., 2015)
rs568711737	Exon 2	c.1774G>A	p.Gly592Arg	G592R	(Zhang et al., 2016)
	Exon 2		p.Pro583_ Pro585del		(Khare et al., 2018)

Tabelle 3: Beispiele für Varianten im *KCNC3*-Gen

Referenz-sequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Mutations-bezeichnung	Autor
unbekannt	Exon1	c.385G>A	p.Asp129Asn	D129N	(Duarri et al., 2012)
rs769502387	Exon2	c.1097G>A	p.Arg366His	R366H	(Figuerola et al., 2010)
rs549394447	Exon2	c.1771A>G	p.Ser591Gly	S591G	(Duarri et al., 2012)
unbekannt	Exon2	c.1603G>A	p.Val535Met	V535M	(Duarri et al., 2012)
rs552133569	Exon2	c.1884G>A	p.Ala628Ala	A628A	(Duarri et al., 2012)

### 1.5.2. Klinische Charakteristika der SCA13

Neben den SCA-typischen cerebellären Symptomen von Gang- und/oder Stand-Ataxie, Dysarthrie und Nystagmus können bei SCA13-Patienten zusätzliche Symptome wie Pyramidenbahnzeichen, Epilepsie, Hörschaden oder kognitive Einschränkungen auftreten. Der Beginn der Erkrankung ist sehr variabel und reicht von der frühen Kindheit bis zum hohen Erwachsenenalter. Die bisher publizierten Fälle zeigten eine langsame Progression der Symptome (Duarri et al., 2015b). In der Bildgebung ist in der Regel eine Atrophie des Kleinhirns nachweisbar.

Nachfolgend sind verschiedenen malignen Mutationen mit klinischen Charakteristika aufgeführt:

### **p.Phe448Leu (Französische Familie)**

Acht von zehn erkrankten Familienmitgliedern wurden im Rahmen der Studie untersucht. Der Beginn der Symptome lag zwischen unter einem Jahr und 45 Jahren. Sechs Patienten waren nicht in der Lage zu rennen, einer konnte mit 38 Jahren nicht alleine laufen und ein anderer war mit 55 Jahren an einen Rollstuhl gebunden. Alle wiesen eine Ataxie mit langsam progredientem Verlauf auf. Dysarthrie hatten sieben von acht. Einen erhöhten Reflexonus zeigten alle acht untersuchten Patienten und einen horizontalen Nystagmus sechs von acht. Einer zeigte zusätzlich vertikale sakkadische Oszillationen. Der IQ lag zwischen 62 und 76. Der Mini-Mental-Status-Test wurde bei fünf Patienten durchgeführt. Er lag zwischen 20/30 bis 25/30 und bestätigte somit eine leichte Demenz (26-18/30). Ein Patient litt unter Petit-mal-Epilepsie, bei der es fraglich war, ob sie dem Symptom-Spektrum der SCA13 zuzuordnen ist. Mit über 50 Jahren kam es bei zwei Patienten zu Schluckbeschwerden, bei zwei zu Harndrang und bei einem zu einer Verlangsamung der Willkürmotorik (Herman-Bert et al., 2000; Waters und Pulst, 2008).

### **p.Arg420His (Philippinische Familie)**

Elf Familienmitglieder aus drei Generationen waren in der philippinischen Familie betroffen (Waters und Pulst, 2008). Im Gegensatz zu der französischen Familie wiesen sie keine mentale Retardierung auf. Im Rahmen der Studie wurden 10 der 11 betroffenen Familienmitglieder untersucht. Die Symptome traten bei der philippinischen Familie in der ersten Generation erst im Erwachsenenalter von 22 bis 60 Jahren auf. In der zweiten Generation traten sie im Durchschnitt mit 36 Jahren und in der dritten Generation mit 24 Jahren auf. Dies weist auf eine Antizipation hin (Waters et al., 2005). Eine Gangataxie wiesen alle Patienten auf, wobei zwei zur Zeit der Studie bereits im Rollstuhl saßen. Weiter war bei zwei von zehn ein schwankender Gang und bei vier von zehn eine Muskelhypotonie feststellbar. Zudem hatten sechs von zehn eine Dysarthrie, einer einen Nystagmus und zwei von zehn einen gesteigerten Reflexonus (Waters und Pulst, 2008).

### **p.Arg423His (Französische Familie 2; sporadischer Patient Niederlande)**

Bei Patienten mit der p.Arg423His Mutation verläuft die Krankheit langsam progredient mit Beginn in der Kindheit. Ein ähnlicher Krankheitsverlauf wurde bei Patienten mit der p.Phe448Leu Mutation beschrieben. Alle Patienten wiesen eine Ataxie auf. In der französischen Familie 2 wurden bei Patienten keine kognitiven Defizite festgestellt (Figuerola et al., 2010). Jedoch zeigte der niederländische Patient eine leichte geistige

Behinderung (Duarri et al., 2012).

### **p.Thr428Ile**

Bei einem 12-jährigen Jungen mit der ursprünglichen Diagnose einer sporadischen ataktischen Zerebralparese wurde mit Hilfe einer Next-Generation-Sequenzierung eine Neumutation im *KCNC3*-Gen identifiziert. Bereits früh zeigte der Junge eine verzögerte motorische Entwicklung und leichte kognitive Einschränkungen. Im Verlauf kam es zum Fortschreiten der Ataxie (Parolin Schnekenberg et al., 2015).

### **p. Gly592Arg**

Diese Variante ist mit einer spät einsetzenden Ataxie verbunden (Zhang et al., 2016).

### **p.Pro583\_Pro585del**

Bei Patienten mit der erst vor kurzem diagnostizierten Mutation p.Pro583\_Pro585del treten erste Symptome im Erwachsenenalter auf. Die Progredienz zeigte in verschiedenen Familien eine weite Spannweite. Sie reicht von einem langsam progredienten Verlauf bis zu einer schnellen und tödlichen Progression mit Symptomen wie Spastik und Tremor (Khare et al., 2018).

## **1.6. *KCNC3*-Gen**

SCA13 wird durch Punktmutationen im *KCNC3*-Gen auf dem Chromosom 19 verursacht. Das *KCNC3*-Gen umfasst einen genomischen Bereich von 18,87 kb und besteht aus fünf Exons, von denen nur vier codierend sind. Die bisher bekannten Mutationen sind in Exon 2 lokalisiert.

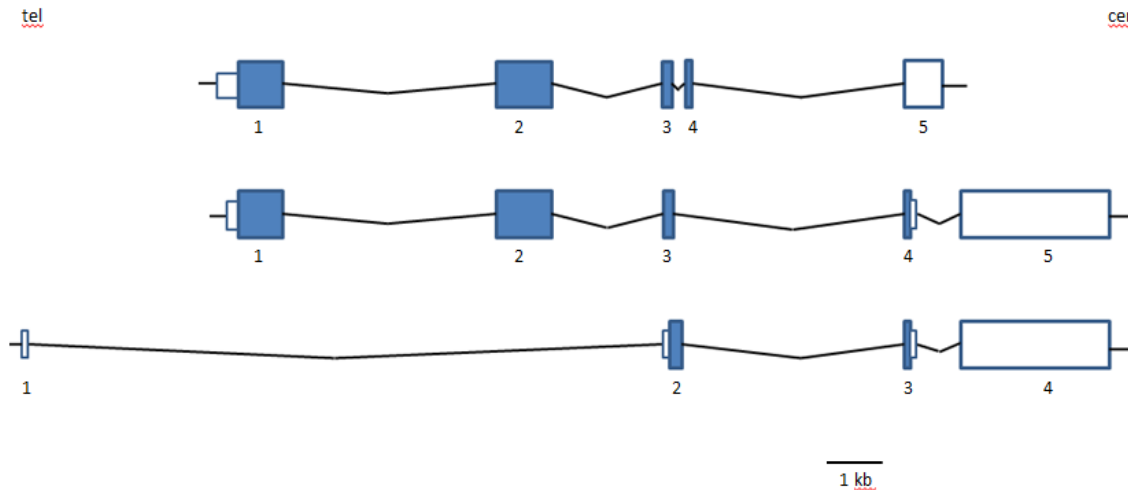


Abbildung 3: Transkripte des *KCNC3*-Gens. Darstellung nach Ensembl genome browser 84. Exons sind blau dargestellt, wobei codierende Bereiche blau ausgefüllt und nicht-codierende Bereiche weiß sind.

Das Protein-Produkt des *KCNC3*-Gens ist der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv3.3 (= *KCNC3*). Strukturell stellen Kaliumkanäle Tetramere da. Es treten sowohl Homo- als auch Heterotetramere auf (Shen und Pfaffinger, 1995; Kalman et al., 1998; Gutman et al., 2005).

Erstmals konnten die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle in der Gattung *Drosophila* nachgewiesen und untersucht werden (Ghanshani et al., 1992; Salkoff et al., 1992). Verschiedene Subfamilien wie Shaker, Shab, Shal und Shaw wurden beschrieben.

Kv3 gehört zu der Shaw-Familie und hat vier Mitglieder (Kv3.1-3.4). Zur besseren Beschreibung wurde als Nomenklatur eingeführt, dass in der Bezeichnung „Kv x.y“ x für die Subfamilie und y für das Mitglied steht (Zhao et al., 2013).

Die einzelnen Kv-Untereinheiten bestehen aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6).

S1-S4 stellen Spannungssensoren dar und S5, S6 bilden zusammen mit einer von außen in die Membran hineinragenden Domäne (re-entrant loop oder P-Region) die Kanalpore (Synders, 1999; Waters et al., 2006). Kennzeichnend für Kv3-Kanäle ist, dass sie erst bei stärkerer Depolarisation (positiver als etwa -20 mV) öffnen und schneller wieder schließen als andere Kv-Kanäle. Durch eine sehr schnelle Repolarisation der Aktionspotentiale und einer kurzen Refraktärzeit können die Neurone eine sehr hohe Frequenz an Aktionspotentialen erzeugen (Zhang und Kaczmarek, 2015). *KCNC3* wird vor allem in schnell feuernden Zellen im Hirnstamm und primär in den Purkinjezellen





P.Arg420His führt zu einer Reduzierung der Kanalaktivität. Jedoch beeinflusst es im Gegensatz zu p.Arg423His und p.Phe448Leu nicht das kinetische Verhalten oder das Spannungsverhalten des Kanals. Dies könnte erklären, warum p.Arg420His einen späten Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter hat und p.Arg423His und p.Phe448Leu bereits im Kindesalter auftreten (Waters et al., 2006; Zhang und Kaczmarek, 2015).

Kv3.3 ist bei Mäusen in Gehirn, Leber, Thymus und Herz exprimiert (Ghanshani et al., 1992). Beim Knock-out vom Kv3.3 zeigten die Mäuse nur geringe motorische Einschränkungen und somit keinen typischen Phänotyp wie beim Menschen. Dagegen konnte bei sogenannten doppelt-knock-out Mäusen (Kv3.3 und Kv3.1) eine deutliche Ataxie und andere Bewegungsstörungen wie Tremor beobachtet werden (Zhang und Kaczmarek, 2015). Dies zeigt, dass die im Mausmodell erhobenen Befunde nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können (Nolte und Müller, 2006).

Wie es durch eine Funktionsänderung des Kanals zum Absterben von Zellen kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. Irie und Kollegen diskutieren, dass durch verlängerte Aktionspotentiale eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration zu einer Neurotoxizität und damit zum Zelltod führen könnte (Irie et al., 2014). Von einer anderen Arbeitsgruppe werden inadäquate synaptische Verbindungen mitverantwortlich für ein Zellsterben während der Gehirnentwicklung gemacht (Issa et al., 2012).

### **1.7. Aufgabenstellung**

In dieser Arbeit sollten DNA-Proben von SCA-Patienten auf krankheitsverursachende Mutationen im *KCNC3*-Gen untersucht werden. Mutationen in *KCNC3* sind schon seit 2006 als kausale Verursacher von SCA13 bekannt. Die wenigen bisher beschriebenen Mutationen wurden ausschließlich in Exon2 detektiert. Dagegen wurde das extrem GC-reiche Exon 1 in der Testung häufig ausgespart. Mit dieser Arbeit sollte die Häufigkeit von Kalium-Kanal-Mutationen unter SCA-Patienten untersucht werden. Dafür wurden die Exons 1-4 von 46 Patienten untersucht. Die ausgewählten Ataxie-Patienten hatten alle eine positive Familienanamnese mit langsam progredienten Verlauf.

### **2. Materialien**

#### **2.1. Chemikalien**

Betain	Sigma, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Steinheim
Ethanol (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Exo-SAP	USB, Staufen
Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Genagarose L.E.	Inno-Train, Kronberg
Sephadex G 50	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England

#### **2.2. Computerprogramme**

SeqAnalysis Version 3.7	Applied Biosystems, Foster City, USA
SeqScape Version 2.5	Applied Biosystems, Foster City, USA

#### **2.3. Enzyme und Nukleotide**

Desoxynucleotide (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
Taq-DNA-Polymerase 1000 U	Qiagen, Hilden

#### **2.4. Geräte**

Analysenwaage PM400 LabStyle 5001	Mettler Toledo, Gießen Mettler Toledo, Gießen
-----------------------------------------	--------------------------------------------------

## 2. Materialien

---

Eiszubereiter AF 80	Scotsman/Frimont, Pogliano Milanese, Italien
Elektrophorese-Kämme: 8, 10 Taschen	Von Keutz, Reiskirchen
Gelschlitten (50 ml)	
Heizblock dri-block DB-3	Techne, Milano, Italien
Horizontale Gelektrophorese-Kammern Horizon 58 (klein)	Gibro-BRL, Gaithersburg, USA
Mikrowelle MS196VUT	LG
Pipetten: 10 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	Eppendorf Reference, Hamburg HTL, Warschau Gilson, Middleton, USA Gilson, Middleton, USA
Spannungsquellen: Biometra	Biometra, Göttingen
Sofortbildkamera Bio-Print	Kaiser
Thermocycler, Tprofessional Basic	Biometra, Göttingen
Thermocycler MJ Research PTC 200	MJ Research, Waltham, USA
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus/Kendro, Hanau
UV-Illuminator Macro Vue UV 25	Hoefer, San Francisco, USA
Vortex RS1	IDL, Nidderau
Wasserbad	GFL, Burgwedel

### **2.5. Kits**

ABI Prism Big Dye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
StraightPCR-OLS-Kit	OMNI Life Science, Hamburg

### **2.6. Lösungen und Puffer**

Ladepuffer	40 % Sucrose (w/v) 1x TBE 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylen-Zyanol (w/v)
10x PCR-Puffer (Qiagen)	Tris HCl pH 8,7 KCl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15 mM MgCl <sub>2</sub>
pUC-Größen-Standard	pUC verdaut mit DdeI (Fragmentlängen: 890/540/426/409/240/166)
5x Reaktionspuffer 1x TBE	Applied Biosystems, Foster City, USA 250 ml 10x TBE ad 2500 ml H <sub>2</sub> O dd
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)	545 g Tris-Base 278 g Borsäure 200 ml EDTA 0,5M, pH 8,2-8,4 ad 5000 ml H <sub>2</sub> O dd
Tris (Trishydroxymethylaminoethan) Puffer 10mM (pH 7,5)	10 mM Tris, pH 7,5 1 mM EDTA Sigma, Steinheim

### **2.7. Verbrauchsmaterialien**

Eppendorf Gefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tube (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
0,2 ml Streifen/Hütchen, Multiply-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Platte (MAHVS N45)	Millipore, Billerica, USA
24-Well-Platte Thermo Fast 24	Thermo Scientific, Waltham, USA

### **3. Methoden**

#### **3.1. DNA-Extraktion**

##### **3.1.1. Grundlagen**

Zur Isolierung von DNA aus dem EDTA-Blut der Patienten wurde der QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen und für eine größere Ausbeute an DNA der NucleoSpin Blood Kit von Macherey und Nagel verwendet. Beide Verfahren bestehen aus folgenden Schritten: Zunächst wird bei erhöhter Temperatur unter Anwesenheit eines Lysepuffers und einer Protease der Zerfall der Blutzellen des Ausgangsmaterials hervorgerufen. Anschließend wird durch Zentrifugieren die DNA an die Membran eines Spinfilters gebunden. Durch Zugabe von Ethanol lässt sich der Ansatz durch den Filter zentrifugieren. Bevor die DNA eluiert wird, werden mit Hilfe von zwei Waschpuffern Verunreinigungen beseitigt (Qiagen Handbuch, 2004).

##### **3.1.2. Durchführung**

Extraktion mit QIAamp DNA Blood Mini Kit:

In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 20 µl Protease, 200 µl der EDTA-Blutprobe und 200 µl Lysepuffer AL gegeben. Nach 15 Sekunden auf dem Vortex wurde der Ansatz 10 min bei 52°C im Wasserbad inkubiert. 200 µl Ethanol wurden hinzugefügt und erneut 15 sec gevortext. Anschließend wurde der Ansatz auf ein QIAamp Säulenfilter aufgetragen und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt und das Eluat verworfen. Weiter wurden 500 µl Waschpuffer 1 (AW1) hinzupipettiert und erneut 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Filter wurde wieder auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt und das Eluat verworfen. Der zweite Waschvorgang erfolgte mit 500 µl Waschpuffer 2 (AW2) und wurde 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abgegossen und der Ansatz erneut 1 min zentrifugiert, um letzte Reste des Ethanol-haltigen Waschpuffers zu entfernen. Das Eluat wurde verworfen und der Säulenfilter auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gestellt. Abschließend wurde 200 µl Eluationspuffer AE hinzugegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurde die gereinigte Patienten-DNA aus der Membran gelöst und konnte bei 4°C gelagert werden.



#### **3.1.3. Extraktion von NucleoSpin Blood Kit**

In ein 50 ml Falcon-Tube wurden 5 ml EDTA-Blut, 520 µl Protease und 5 ml Lysepuffer BQ1 gegeben. Nach dem Vortexen wurde der Ansatz zum Inkubieren für 25 min bei 56°C in ein Wasserbad gestellt. Bevor der Ansatz für 5 min auf Eis gekühlt wurde, wurden 5 ml Ethanol hinzugefügt und erneut für 10 sec gevortext. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Säule übertragen und bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Röhrchen gestellt und das Eluat verworfen. Für die Waschvorgänge wurden beide Male 7,5 ml Waschpuffer BQ2 aufgetragen. Beim ersten Mal wurde dabei für 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert und beim zweiten Mal für 10 min bei 5000 rpm. Für die Elution wurden 600 µl Elutionspuffer BE hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei Raumtemperatur wurde für 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Ansatz wieder auf die Säule übertragen, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

#### **3.2. Quantifizierung der DNA**

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der DNA werden anhand einer Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration lässt sich aus der Extinktion mit folgender Formel berechnen:  
$$C \text{ (}\mu\text{g/mL)} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor (F)}$$

$OD_{260}$  steht dabei für die Extinktion bei 260 nm. Bei einer optischen Dichte von 1 ( $OD_{260}=1$ ) entspricht der Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNA dem Faktor 50. Da Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine bei 280 nm haben, kann der Reinheitsgrad der DNA aus dem Quotienten der Extinktionswerten 260 und 280 bestimmt werden. Bei einer sauberen Nukleinsäurepräparation sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2 liegen (Jahnson und Rothhämel, 2012).

## **3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

### **3.3.1. Grundlagen**

1993 erhielt Karl Mullis zusammen mit Michael Smith den Nobelpreis für Chemie, für die um 1983 entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), ein Verfahren mit dessen Hilfe spezifische DNA-Abschnitte exponentiell ( $2^n$ ) vervielfältigt werden können. Diese auch als DNA-Amplifikation bezeichnete Methode benötigt nur geringe Mengen an DNA als Ausgangsmaterial.

Durch zwei gegenläufig orientierte, den DNA-Strängen komplementäre Oligonukleotid-Primer mit einer Basenlänge von 16-28 Nukleotiden wird der zu amplifizierende Bereich festgelegt. Die Wahl der Primer ist entscheidend für die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR. Folgende Parameter sollten dabei berücksichtigt werden: Die Längendifferenz zwischen den zwei Primern sollte drei Nukleotide nicht überschreiten und der GC-Gehalt zwischen 40-60 % liegen. Einen der wichtigsten Punkte stellt die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) dar: Die Differenz zwischen den  $T_m$  der Primer sollte hier nicht mehr als 5°C betragen, optimal wären 0°C (Jahnson und Rothhämel, 2012). Bestimmen kann man die  $T_m$  zum Beispiel durch die Wallace-Formel, die für ein GC-Paar 4°C und für ein AT-Paar 2°C berechnet. Dabei stehen G, C, A, T für die Nukleotide Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin. Die Bildung von Dimeren und Sekundärstrukturen, also die Hybridisierungen zwischen den Primern oder innerhalb eines Primers, sollte verhindert werden. Dies wird durch Vermeidung von Komplementarität der Primerpaare erreicht. Um die Primer optimal zu designen, stehen heute verschiedene Computerprogramme zur Verfügung. Des Weiteren benötigt man eine hitzestabile DNA-Polymerase wie die Taq-Polymerase. Diese stammt aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) und hat ein Temperaturoptimum bei 75°C. Die Taq-Polymerase hält wiederholten Erhitzungen auf 95°C stand, wodurch eine Automatisierung der PCR möglich ist. Weiterhin benötigt man vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und einen Puffer, der  $Mg^{2+}$  enthält, um eine geeignete physiologische Umgebung für die DNA-Polymerase zu gewährleisten.

Jeder Zyklus der PCR besteht aus den folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung: Bei Erhitzung auf etwa 90-94°C wird die doppelsträngige Template-DNA durch Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen in ihre Einzelstränge

aufgetrennt.

2. Annealing: Durch das Abkühlen auf etwa 50-60°C (abhängig von den verwendeten Primern) können die Primer als Startermoleküle an die einzelsträngige DNA hybridisieren.

3. Elongation: Bei etwa 72°C beginnt die Taq-Polymerase ausgehend vom 3'-Ende der Primer durch Elution der zum Einzelstrang komplementären Nukleotide einen neuen Doppelstrang zu synthetisieren.

Eine repetitive Wiederholung der Schritte 1. bis 3. ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung von kleinen Bereichen der Ausgangs-DNA, bis die Taq-Polymerase an Aktivität verliert und es nur noch zu einem linearen Anstieg der Kopien und schließlich zu einem Plateau kommt (Jahnson und Rothhämel, 2012).

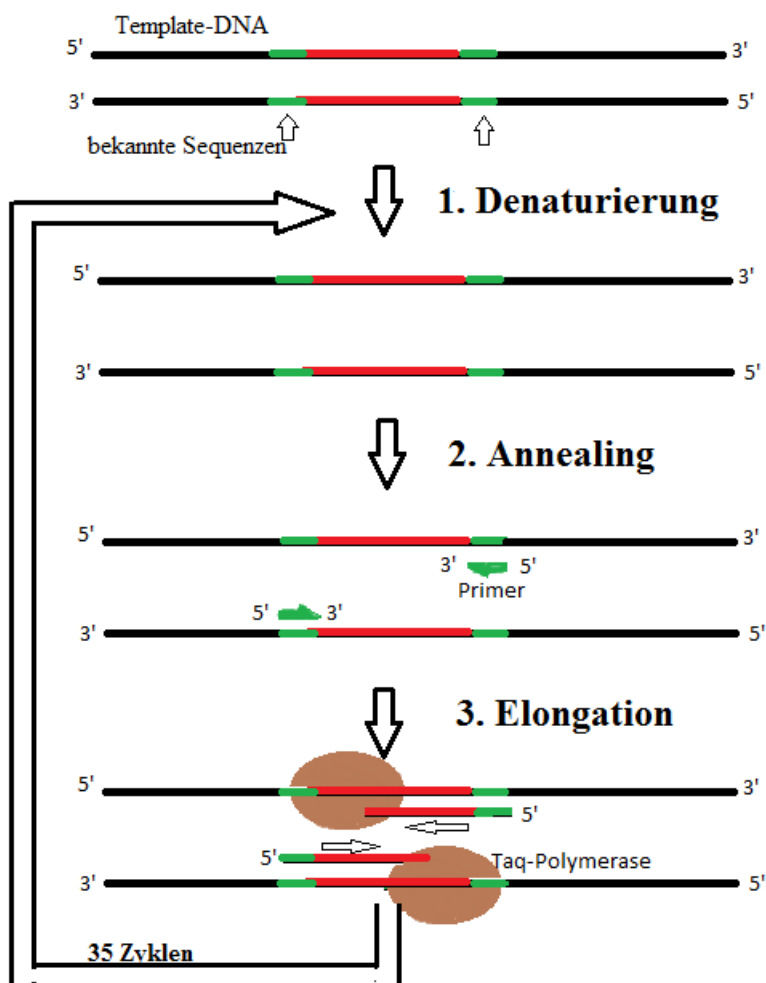


Abbildung 5: Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion

### 3.3.2. Durchführung der *KCNC3*-PCR

Als Template-DNA dienten 50 DNA-Proben von Ataxiepatienten. Das zu untersuchende *KCNC3*-Gen besteht aus vier kodierenden Exons. Für Exon 2 bis 4 wurde jeweils ein Primerpaar verwendet. Aufgrund der Komplexität und der Größe des Exons 1 wurde dieses auf drei Primerpaare aufgeteilt.

Im Folgenden ist das Pipettierschema für die einzelnen Exons zu sehen:

Tabelle 4: Pipettierschema

<b>Exon</b>	<b>1</b>			<b>2</b>	<b>3-4</b>	<b>4</b>
Primer sense	Ex1neu_F	Ex1_6F	Ex1_8F	Ex2F	Ex3F_neu	Ex4F
Primer antisense	Ex1Ra	Ex1_7R	Ex1_9R	Ex2R	Ex4R_neu	Ex4R
<b>Mix in µl</b>						
H <sub>2</sub> O	53	43	38	112	132	112
Betain	10	20	25	20		20
10x PCR- Puffer	10	10	10	20	20	20
Nukleotide	20	20	20	40	40	40
Primer sense	3	3	3	3	3	3
Primer antisense	3	3	3	3	3	3
Taq- Polymerase	1	1	1	2	2	2
<b>Summe</b>	100	100	100	200	200	200
zu 1 µl DNA	32	32	32	48	38	38

Zur Durchführung wurde ein Tprofessional Basic Thermocycler der Firma Biometra verwendet. Bei diesem ist sowohl die Temperatur und Zeit für den jeweiligen Reaktionsschritt als auch die Anzahl der Zyklen individuell, je nach Primer einstellbar. Angefangen hat es mit der initialen Denaturierung von 3 min bei 95°C. Danach folgten 35 Zyklen mit je einer Denaturierungsphase von 30 sec bei 94-95°C, einer Annealingphase von 30 sec bei 58-70°C und einer Polymerisationsphase von 30-45 sec bei 72°C. Abschließend wurde eine Polymerisationsphase von 2-3 min bei 72°C durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde dann entweder weiterverwendet oder eingefroren bei -20°C.

#### **3.3.3. Aufreinigung**

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das Straightpcr-OLS System nach Angaben des Herstellers verwendet. Spin-Filter wurden in Receiver-Tuben gestellt. In jeden Spin-Filter wurden 500 µl Puffer BB („Bindepuffer“) pipettiert. Nach Hinzufügen des jeweiligen PCR-Produktes wurde durch 2 Minuten langes Zentrifugieren bei 10000 rpm die kleinen Moleküle (Nukleotid- und Primerreste) von den größeren DNA-Fragmenten, die im Spin-Filter hängen blieben, getrennt. Anschließend wurden die Receiver-Tuben verworfen. Die Spin-Filter wurden sogleich in neue Eppendorf-Gefäße gestellt. Nach Zugabe von 20-30 µl Puffer EB („Elutionspuffer“) wurde eine Minute bei 7000 rpm zentrifugiert und die DNA von dem Filter gelöst. Im Eppendorfgefäß befand sich nun das gereinigte PCR-Produkt.

#### **3.3.4. Exo-SAP**

Um überschüssige Primer zu entfernen, wurde vor der Sequenzierung der PCR-Fragmente zur Gewährleistung der Reinheit ein Exo-SAP durchgeführt. Die Menge der übriggebliebenen Primer konnte anhand des Agarosegels abgeschätzt werden. Zu 1,9-2,4 µl H<sub>2</sub>O wurden 2-2,5 µl gereinigtes PCR-Fragment und 0,6 µl Exo-SAP gegeben. Bei 37 °C erfolgte im Thermocycler durch die Exonuclease I des Exo-SAPs der Abbau von einzelsträngiger DNA und übriggebliebenen Primern und bei anschließenden 80 °C durch die Shrimp Alkaline Phosphatase des Exo-SAPs die Aufspaltung von verbleibenden dNTPs.

#### **3.4. Agarosegelelektrophorese**

##### **3.4.1. Grundlagen**

Die erhaltenen DNA-Fragmente können durch die Agarosegelelektrophorese im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Um die Größe des Fragments zu bestimmen, dient ein Größenstandard mit definierten Banden. Je hochprozentiger das Agarosegel, desto engermaschiger ist das Gitter. Durch das elektrische Feld wandern die DNA-Fragmente durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Dabei sind kleinere Moleküle schneller als große. Durch die Fluoreszenz-Eigenschaft des Ethidiumbromid, das sich in die Nukleinsäuren einlagert, können die einzelnen DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

##### **3.4.2. Durchführung**

Zur Herstellung eines 1,5 %igen Gels wurden 750 mg Agarose in einen Erlenmeyer-Kolben abgewogen und 50 ml 1x TBE-Puffer hinzugegeben. Nach Aufkochen in einem Mikrowellengerät lässt man die Agarose-Gellösung abkühlen. Bevor sie in eine Gelkammer (7 x 8,5 cm) mit ein bis zwei Kämme mit je 10 Taschen gegossen wurde, waren 2 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben worden. Nun konnte das Gel bei Raumtemperatur erstarren oder es wurde bis zum Verwenden im Kühlschrank gelagert. Nach Entfernung der Kämme wurde das Gel mit Richtung der Kämme zur Kathodenseite in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Zur Kontrolle der PCR-Effizienz wurden je 3 µl PCR-Produkt mit 6 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Ladepuffer versetzt und jeweils in eine Gelkammer pipettiert. In einer separaten Tasche wurde der Größenstandard pUC/ Dde I aufgetragen. Durch das Anlegen einer Stromstärke von 35-45 mA erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren. Beobachten ließ sich die Wanderungsgeschwindigkeit anhand des Ladepuffers, der die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-Zyanol enthielt.

##### **3.4.3. Auswertung**

Durch die Fluoreszenz-Eigenschaft des in der Nukleinsäure eingelagerten Ethidiumbromids konnten die DNA-Banden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Mithilfe einer Sofortbildkammer wurden die Bandenmuster fotografiert. Anhand des mitgelaufenen Größenstandards konnten die Größen der DNA-Fragmente bestimmt werden.

#### **3.5. Sequenzierung**

##### **3.5.1. Grundlagen**

Paul Berg, Walter Gilbert und Frederick Sanger erhielten für ihre Arbeiten zur Sequenzierung 1980 den Nobelpreis für Chemie. Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung ist es möglich, die Abfolge einzelner Nukleotide von DNA-Fragmenten zu bestimmen und eventuell vorliegende Mutationen zu finden. Die Methode der chemischen Modifikation von Basen und anschließendem Strangbruch nach Maxam und Gilbert wird heute aufgrund des aufwendigen Verfahrens jedoch nur noch selten eingesetzt. Dagegen ist die enzymatische Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) bis heute die Sequenzierungsmethode der Wahl.

Im Folgenden wird die in der Arbeit verwendete Zyklussequenzierung näher beschrieben. Das Prinzip ähnelt dem der PCR. Es wird ebenfalls eine hitzestabile DNA-Polymerase eingesetzt. Die Schritte Denaturierung, Annealing und Polymerisation werden auch hier durchlaufen. Dabei wird allerdings nur ein Strang linear synthetisiert. Die Sequenzierungsansätze enthalten neben den vier dNTPs zusätzlich die vier Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs), die jeweils mit einem Farbstoff markiert sind. Die DNA-Polymerase kann sowohl dNTPs als auch ddNTPs zur Kettenverlängerung verwenden. Beim Einbau eines ddNTPs kommt es aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylasegruppe zum Kettenabbruch. Durch diese zufälligen Abbrüche entstehen DNA-Fragmente verschiedener Länge. Statistisch gesehen liegt bei einem gut eingestellten Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs jede Länge vor. Zur Auftrennung der Fragmente wurde in dieser Arbeit ein ABI Prism 3130 XL Kapillarsequenzierer eingesetzt. Dabei werden die zu bestimmenden Fragmente in dünnen, mit Polyacrylamidgel befüllten Glasröhrchen der Größe nach aufgetrennt. Durch einen Laser werden die fluoreszenzmarkierten ddNTPs angeregt und die emittierte Wellenlänge durch einen Detektor erkannt und grafisch dargestellt. Jede Base entspricht dabei einem Peak. Es gibt jeweils eine Farbe für A, C, G und T gibt. Die Zyklussequenzierung bietet gegenüber der herkömmlichen Methode viele Vorteile:

So benötigt man z.B. weniger Ausgangs-DNA, die höhere Temperatur verringert die Ausbildung von Sekundärstrukturen und durch die vier verschiedenen Farbstoffe braucht man statt vier Reaktionsansätzen nur einen (Clark und Pazdernik, 2009).

#### **3.5.2. Durchführung**

Zu dem gereinigten PCR-Fragment wurden 5-6 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl 5x Reaktionspuffer, 1,5 µl Primer (PCR-Primer 5:1 verdünnt auf 10 pmol/µl) und 2,5 µl lichtempfindlichen ABI-Mix, der die vier fluoreszenzmarkierten Nukleotide enthielt, pipettiert, sodass man auf 15 µl kam. Im Thermocycler erfolgte zunächst eine Denaturierung von 1 min bei 96°C. Danach folgten 25 Zyklen mit jeweils einer Denaturierungsphase von 10 sec bei 96°C, einer Annealingphase von 10 sec bei 63-68°C und einer Polymerisationsphase von 2,5 min und bei 60-65°C.

#### **3.5.3. Reinigung der Sequenzierungsansätze**

Um erneut überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen, wurde nach der Sequenzierung eine Aufreinigung durchgeführt. Dafür wurde in eine 96-Well-Platte pro Sequenzierungsansatz jeweils 300 µl gequollenes Sephadex G50 in ein Well pipettiert. Nach dem Austarieren der Platten wurden diese 2 min bei 2100 rpm zentrifugiert und die Flüssigkeit in der Abwurfplatte verworfen. Die Sephadexplatte wurde auf die Eluatplatte gestellt und die Sequenzierungsreaktionen aufgetragen. Nach erneutem Austarieren der Platten und nachdem 2 min bei 2100 rpm zentrifugiert wurde, wurden die Proben aus der Eluatplatte zusammen mit 15 ml Formamid in einen Multiwellstreifen gegeben. Zur Analyse wurden die Multiwellstreifen dann lichtgeschützt an die Blutbank der Universitätsklinik Gießen weitergeleitet.

#### **3.5.4. Auswertung der Sequenzdaten**

Zur Auswertung der Sequenzierdaten dienten die Softwareprogramme SeqAnalysis und SeqScape der Firma Applied Biosystems. Durch das Computerprogramm SeqAnalysis Version 3.7 erfolgte die Vorauswahl, so dass nur auswertbare Sequenzen in das Programm SeqScape Version 2.5 kamen, um dieses Programm nicht zu überlasten. Durch dieses Programm konnte jedes Exon einzeln analysiert und dargestellt werden. Zudem ermöglichte es das Vergleichen von Sequenzen untereinander und mit einer Referenzsequenz.



### **4. Ergebnisse**

Um eine Aussage über die Häufigkeit der SCA13 bei Ataxie-Patienten machen zu können, wurden 46 deutsche Patientinnen und Patienten auf Varianten im *KCNC3*-Gen untersucht. Die Familienanamnese aller Patienten weist auf eine autosomal dominant vererbte Ataxie mit langsamem Verlauf hin. Vor Beginn der Arbeit wurde bei den Patienten SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 und SCA17 (Repeatexpansionen), sowie SCA14, SCA19, SCA23 und SCA28 (Punktmutationsscreening) ausgeschlossen.

Um Veränderungen in der Sequenzabfolge feststellen zu können, wurden alle vier Exons des *KCNC3*-Gens durch eine PCR amplifiziert, danach sequenziert und die Elektropherogramme mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgewertet.

#### **4.1. Patientenkollektiv**

Die DNA-Proben für die vorliegende Arbeit stammen von 46 deutschen Patienten, deren Proben zwischen 1999 und 2015 nach einer genetischen Beratung und einer Einverständniserklärung gemäß Gendiagnostikgesetz entnommen wurden. Das Patientenkollektiv umfasste 22 weibliche und 23 männliche Personen. Alle Patienten wiesen eine langsame progrediente Gangstörung in Form einer Ataxie auf. Zum Teil wurden weitere Symptome diagnostiziert: Z.B. bei drei Patienten eine Dysphagie, bei zwölf Personen eine Dysarthrie und bei acht Patienten eine okulomotorische Störungen, meist in Form eines Nystagmus. Im cMRT wurde bei zehn Personen eine Kleinhirnatrophie festgestellt. Außerdem hatten acht Patienten eine kognitive Störung in Form einer Demenz, Wesensveränderung oder Intelligenzminderung. Zudem traten vereinzelt Tremor, Parkinson-Syndrom, Epilepsie und gesteigerte Eigenreflexe auf. Bei den meisten Patienten konnte mit Hilfe der Familienanamnese ein Verwandter ersten Grades mit ähnlichen Symptomen ermittelt und auf einen autosomal dominanten Erbgang geschlossen werden.

Tabelle 5: Herkunft der Proben

Einsender der Proben	Anzahl der Proben
Gertrudis-Klinik Biskirchen	1
Klinik Vitos Weilmünster	4
Klinikum Fulda	1
Klinikum Wetzlar	1
Klinikum Wilhelmshaven	1
Nieder-Ramstädter Diakonie Mühlthal	1
Praxis in Gießen	1
Praxis in Hamburg	1
Praxis in Königstein	1
Praxis in Zwickau	1
Universitätsklinik Frankfurt	19
Universitätsklinik Gießen	8
Universitätsklinik Heidelberg	1
Universitätsklinik Kiel	2
Universitätsklinik Mainz	1
Universitätsklinik Marburg	2

#### **4.2. Veränderungen der Sequenzabfolge**

Folgend werden die in den verschiedenen Exons des *KCNC3*-Gens gefundenen Sequenzabweichungen im Bezug zu einer Referenzsequenz der Genbank ENSEMBL erläutert und mit den in der Literatur beschriebenen Polymorphismen verglichen. Das vergleichende Transkript auf ENSEMBL hat die Leserichtung Telomer zu Zentromer. So ist z.B. ein Austausch von Cytosin zu Thymin in einer durchgeführten Sequenz, die mit dem SeqScape-Programm ausgewertet wurde, in der Vergleichsequenz ein Austausch von Guanin zu Adenin.

## 4.2.1. Exon 1

Bei einem Patienten wurde ein Austausch von Guanin (G) zu Adenin (A) an cDNA (c) Position 188 festgestellt (siehe Abbildung 1). Diese Variante gehört zu den Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNPs). Dabei unterscheiden sich die Allele in einer einzigen Nukleotidbase. Durch diesen Basenaustausch verändert sich die Aminosäuresequenz und aus Glycin (GGC) wird Asparaginsäure (GAC). Das Referenzgenom weist an dieser Position ebenfalls ein Adenin auf, wobei der größte Teil der Bevölkerung an dieser Stelle ein Guanin zeigt. Nur 4,8 % haben laut Literaturangaben an Position c.188 ein Adenin vorliegen. Es handelt sich hierbei um einen bekannten Polymorphismus (rs375912738). Auch im betrachteten Patientenkollektiv war G das häufigere Allel mit etwa 98 %.

Tabelle 6: Darstellung der Sequenzänderung c.188A&gt;G im Exon 1

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz*
rs375912738	Exon 1	c.188A>G	p.Asp63Gly	A: 0.048

\*EVA\_EXAC: EXAC\_0.3

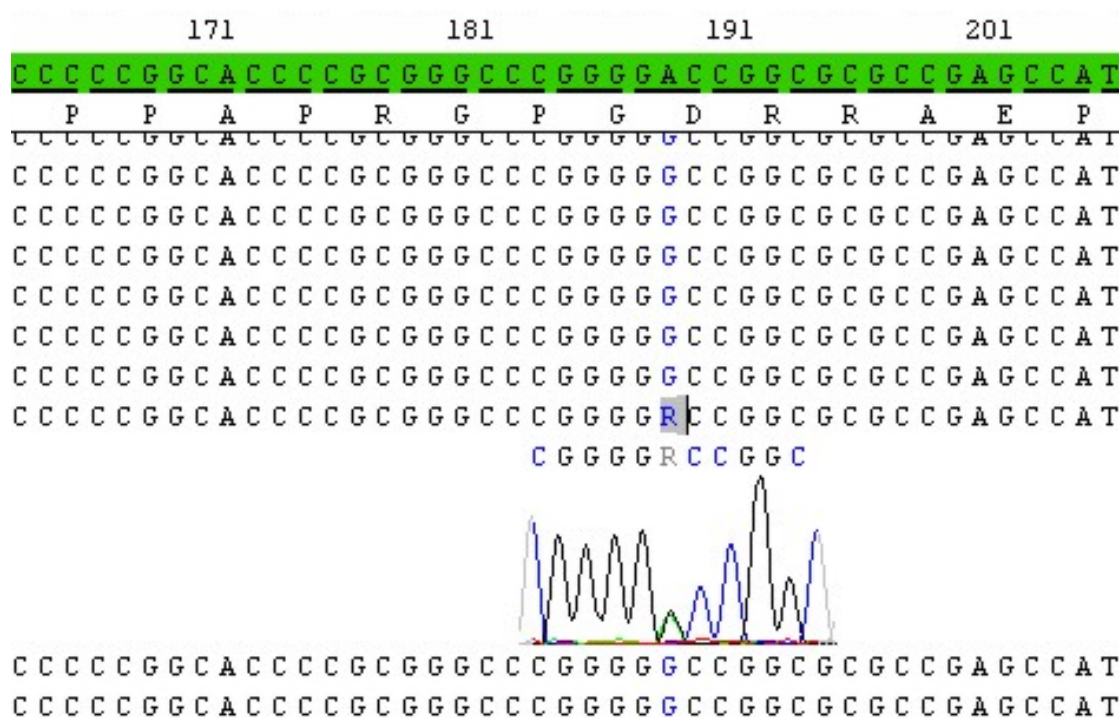
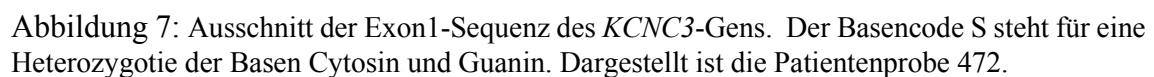


Abbildung 6: Ausschnitt der Exon1-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode R steht für eine Heterozygotie der Basen Guanin und Adenin. Dargestellt ist die Patientenprobe 597.

3 Proben wiesen an Position 141 eine Transversion von Cytosin (C) zu Guanin (G) auf. Genetisch betrachtet würde die dritte Position des Codons verändert, aber dennoch die gleiche Aminosäure eingebaut werden. Der G-Peak hat jedoch nicht den identischen Ausschlag wie das C, zudem ist etwas Hintergrund zu beobachten. Dadurch stellt sich die Frage, ob ein Sequenzierungsartefakt vorliegen könnte. Der Austausch ist bisher nicht bekannt.

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
	Exon 1	c.141C>G	p.Gly47Gly	unbekannt



#### 4. Ergebnisse

Eine Person wies einen bekannten Austausch von Cytosin zu Adenin an Position c.-6 auf. Die Variante befindet sich sechs Basen vor dem Translationsstartcodon. Im ExAC-Browser wurde diese Variante bei 3224 untersuchten Personen nur bei einem Asiaten beschrieben. Aufgrund einer so seltenen Frequenz und der Position der Variante im konservierten Bereich um den Translationsstart (Kozak-Sequenz) (Kozak, 1987) ist es eher unwahrscheinlich, dass dieser Austausch ein Polymorphismus ist.

Tabelle 8: Darstellung der Sequenzänderung c.-6C>A im Exon 1

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
rs111909830	Exon 1	c.-6C>A		A: 0.00016

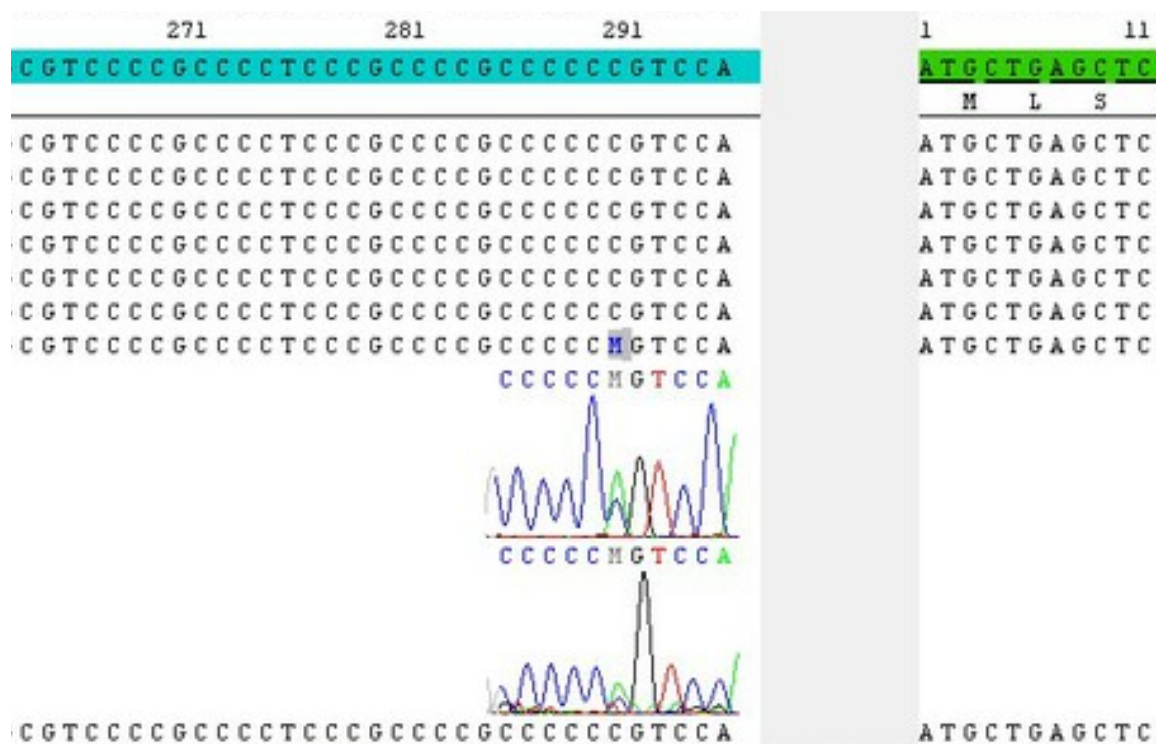


Abbildung 8: Abbildung des Übergangs der Exon1-Sequenz des *KCNC3*-Gens vom nicht-kodierenden (blau) zum kodierenden (grün) Bereich. Der Basencode M steht für eine Heterozygotie der Basen Cytosin und Adenin. Dargestellt ist die Patientenprobe 1119.

### 4.2.2. Exon 2

Ein Studienteilnehmer zeigte eine noch nicht beschriebene stille Mutation an Position 1788. Der Austausch von Guanin (G) zu Adenin (A) ändert nichts an der Aminosäure Prolin.

Tabelle 9: Darstellung der Sequenzänderung c.1788G>A im Exon 2

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
	Exon 2	c.1788G>A	p.Pro596Pro	unbekannt

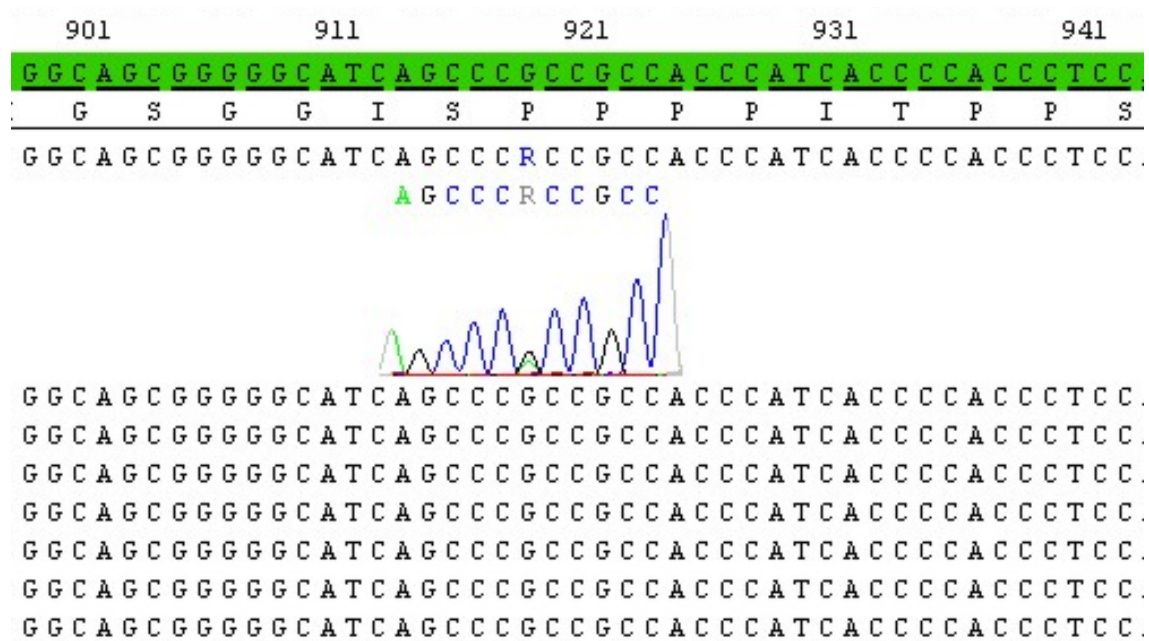


Abbildung 9: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode R steht für eine Heterozygotie der Basen Guanin und Adenin. Dargestellt ist die Patientenprobe 331.



#### 4. Ergebnisse

Zwei Patienten zeigten eine noch nicht bekannte Sequenzänderungen von Guanin (G) zu Adenin (A) an den Positionen 1674 und 1677. Aufgrund des Hintergrundes bereits an Position 1671 kann ein Artefakt nicht ausgeschlossen werden. Jedoch sind die Ausschläge in Phase zueinander. In beiden Fällen würde es nichts an der AS-Sequenz ändern, da die Aminosäure Lysin erhalten bleibt.

Tabelle 10: Darstellung der Sequenzänderung c.1674G>A und c.1677G>A im Exon 2

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
	Exon 2	c.1674G>A	p.Lys558Lys	unbekannt
	Exon 2	c.1677G>A	p.Lys559Lys	unbekannt

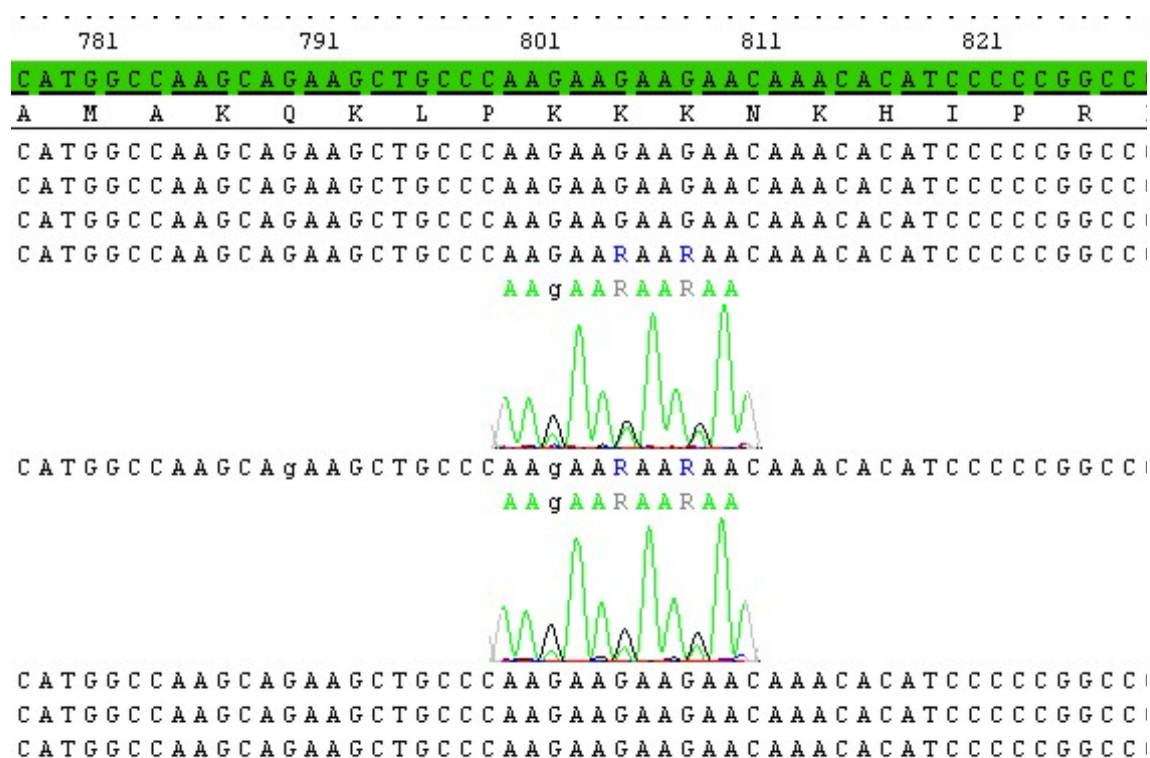


Abbildung 10: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode R steht für eine Heterozygotie der Basen Guanin und Adenin. Dargestellt sind die Patientenproben 912 und 980.

#### 4. Ergebnisse

Bei einem der vorher beschriebenen Patienten wurde zudem ein noch nicht beschriebener heterozygoter Austausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) (c.1891C>T) gefunden. Es handelt sich ebenfalls um eine stille Mutation, da die Aminosäure Leucin bestehen bleibt.

Tabelle 11: Darstellung der Sequenzänderung c.1891C>T im Exon 2

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
	Exon2	c.1891C>T	p.Leu631Leu	unbekannt

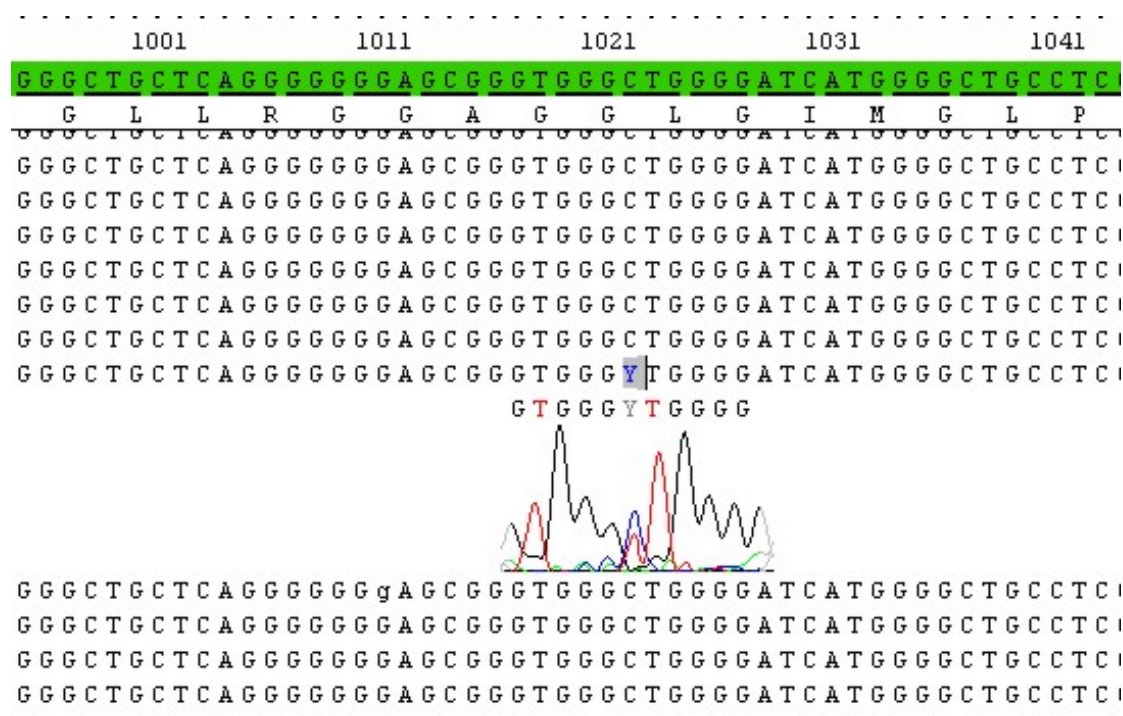


Abbildung 11: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode Y steht für eine Heterozygotie der Basen Cytosin und Thymin. Dargestellt ist die Patientenprobe 980.



Im Exon 2 wurde zudem bei einem Patienten die bekannte Variante an c.1929 entdeckt. In dieser Variante kommt es zu einem heterozygoten Austausch von C zu T. GGC und GGT codieren beide für Glycin, wodurch die AS-Sequenz bestehen bleibt. Die Häufigkeit dieses SNPs (rs111744086) liegt in der Bevölkerung bei 1 %. In unserer Studienpopulation liegt die Häufigkeit bei etwa 2 %. In Abbildung 6 ist diese stille Mutation zu sehen. Die Peaks im Elektropherogramm sind leicht verschoben. Da aber sonst kein Hintergrund zu sehen ist und es sich um eine GC-reiche Region handelt, kann von einer Variante und nicht einem Sequenzartefakt ausgegangen werden.

Tabelle 12: Darstellung der Sequenzänderung c.1929C>T im Exon 2

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
rs111744086	Exon2	c.1929C>T	p.Gly643Gly	T: 0.01

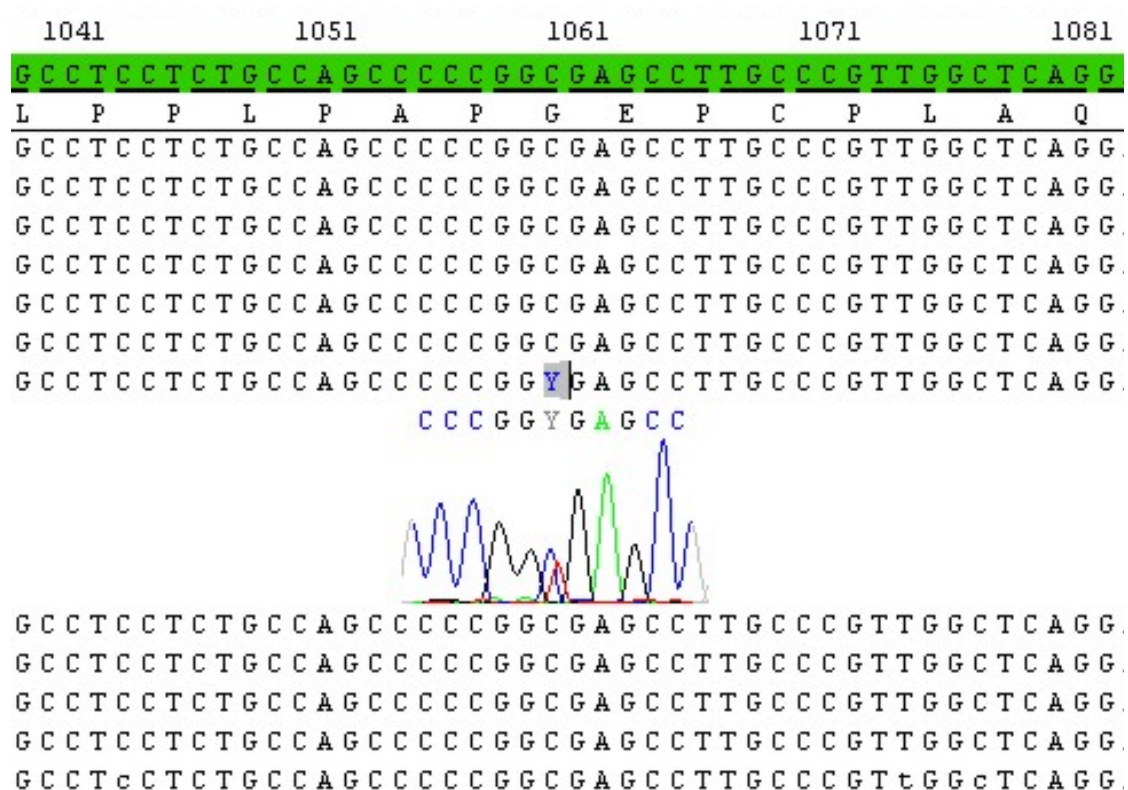


Abbildung 12: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des KCNC3-Gens. Der Basencode Y steht für eine Heterozygotie der Basen Cytosin und Thymin. Dargestellt ist die Patientenprobe 1110.

### 4.2.3. Exon 3

Bei einem Probanden wurde heterozygot an c.2082 ein G durch ein A ersetzt. Diese noch nicht beschriebene stille Mutation hat keine klinische Konsequenz, da die AS-Sequenz durch den Erhalt von Threonin bestehen bleibt.

Tabelle 13: Darstellung der Sequenzänderung c.2082G>A im Exon 3

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
	Exon 3	c.2082G>A	p.Thr694Thr	unbekannt

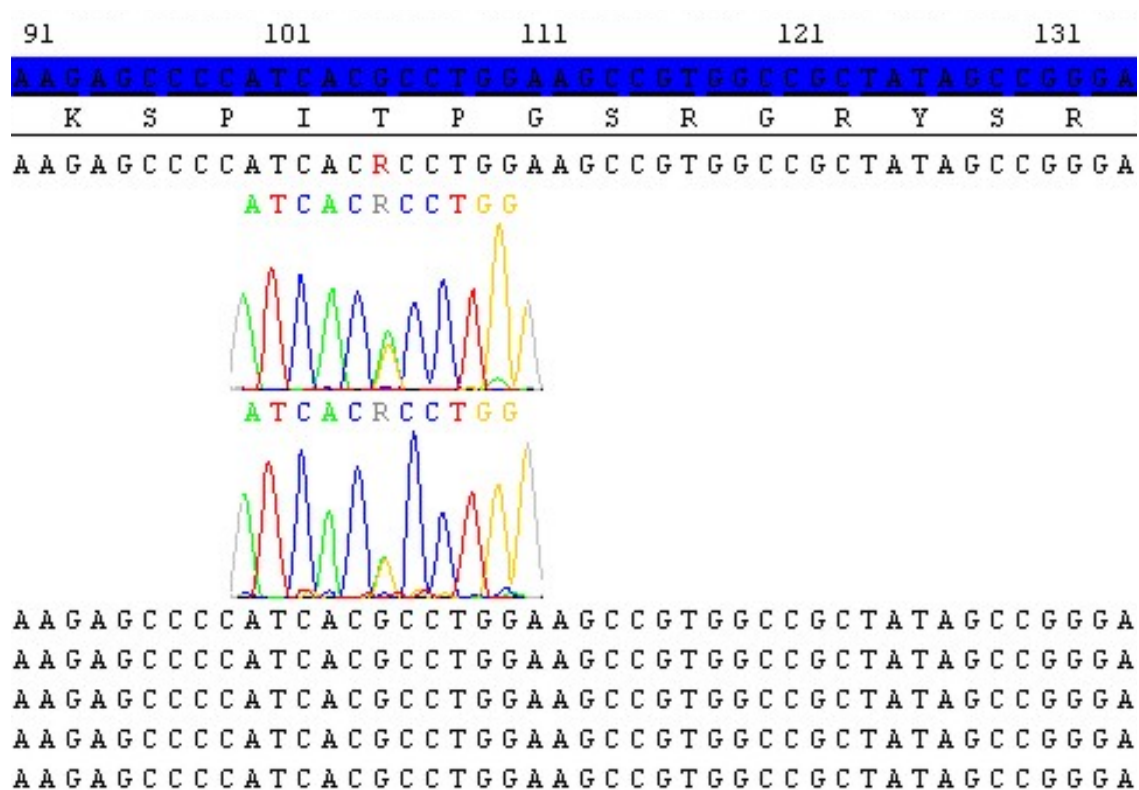


Abbildung 13: Ausschnitt der Exon3-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode R steht für eine Heterozygotie der Basen Guanin und Adenin. Dargestellt ist die Patientenprobe 453.

#### 4. Ergebnisse

Die Variante im Intron 3 (intervening sequence, IVS3) an der Position +14 wurde bei 3 Patienten heterozygot nachgewiesen. Es fand ein Austausch von Cytosin zu Thymin statt. In der Literatur ist zudem ein Austausch von Cytosin zu Adenin beschrieben. Weltweit haben 99 % der Menschen an dieser Stelle ein C und 1% ein A oder T. Dabei wurde A bis jetzt nur in Südasien gefunden und T mit 2 % in Europa. In der vorliegenden Arbeit hatten 3 von 46 Patienten ein T. Dies lässt eine höhere Prozentzahl in Europa vermuten.

Tabelle 14: Darstellung der Sequenzänderung IVS3+14C>T im Intron 3

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
rs189018316	Intron 3	c.2170+14C>T		T: 0.04

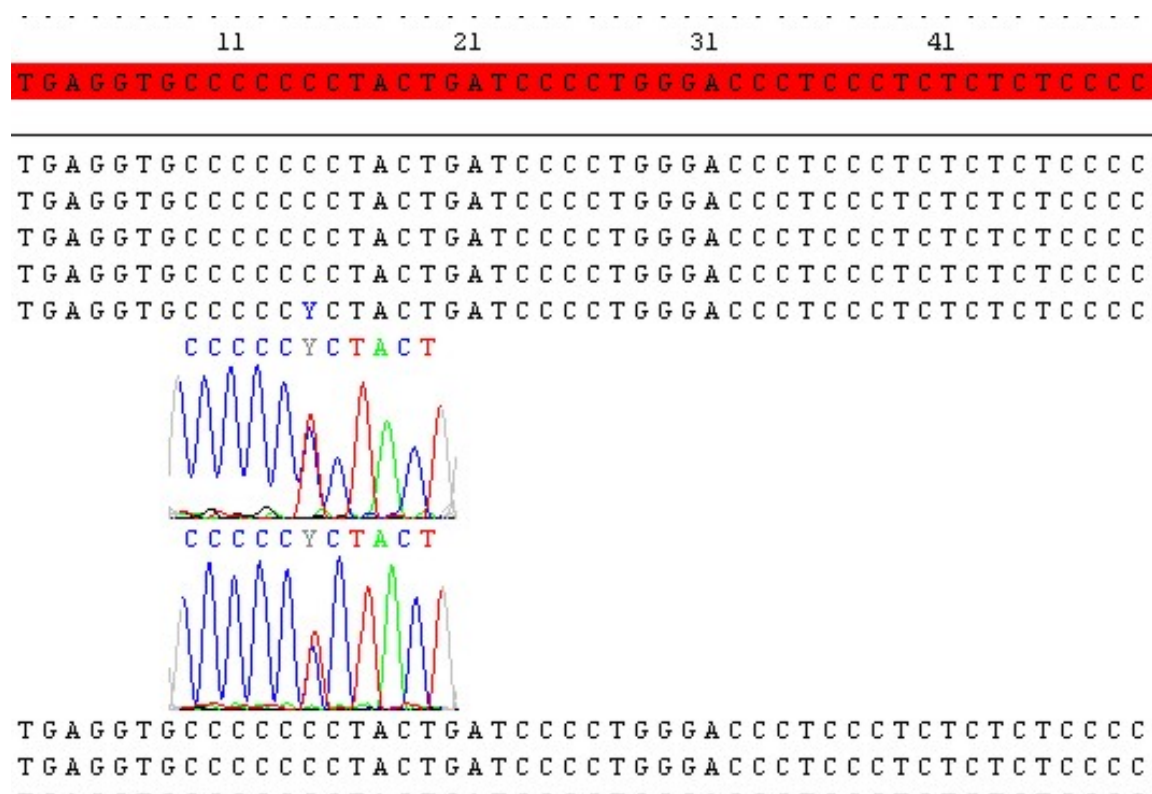


Abbildung 14: Ausschnitt der Intron3-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode Y steht für eine Heterozygotie der Basen Cytosin und Thymin. Dargestellt ist die Patientenprobe 948.

#### 4.2.4. Exon 4

Bei einem Patienten fand sich die bekannte Variante c.2171-26T>C. 2171 steht dabei für die erste Base des Exons 4. Nach Literaturangaben haben weltweit etwa 3 % der Menschen, in Europa nur etwa 1 % diesen SNP. In der betrachteten Population lag die Häufigkeit bei etwa 2 %.

Tabelle 15: Darstellung der Sequenzänderung c.2171-26T>C im Exon 4

Referenzsequenz	Exon/Intron	Genomische Position	Aminosäuren Position	Globale Allelfrequenz
rs185032351	Intron 3	c.2171-26T>C		C: 0.03

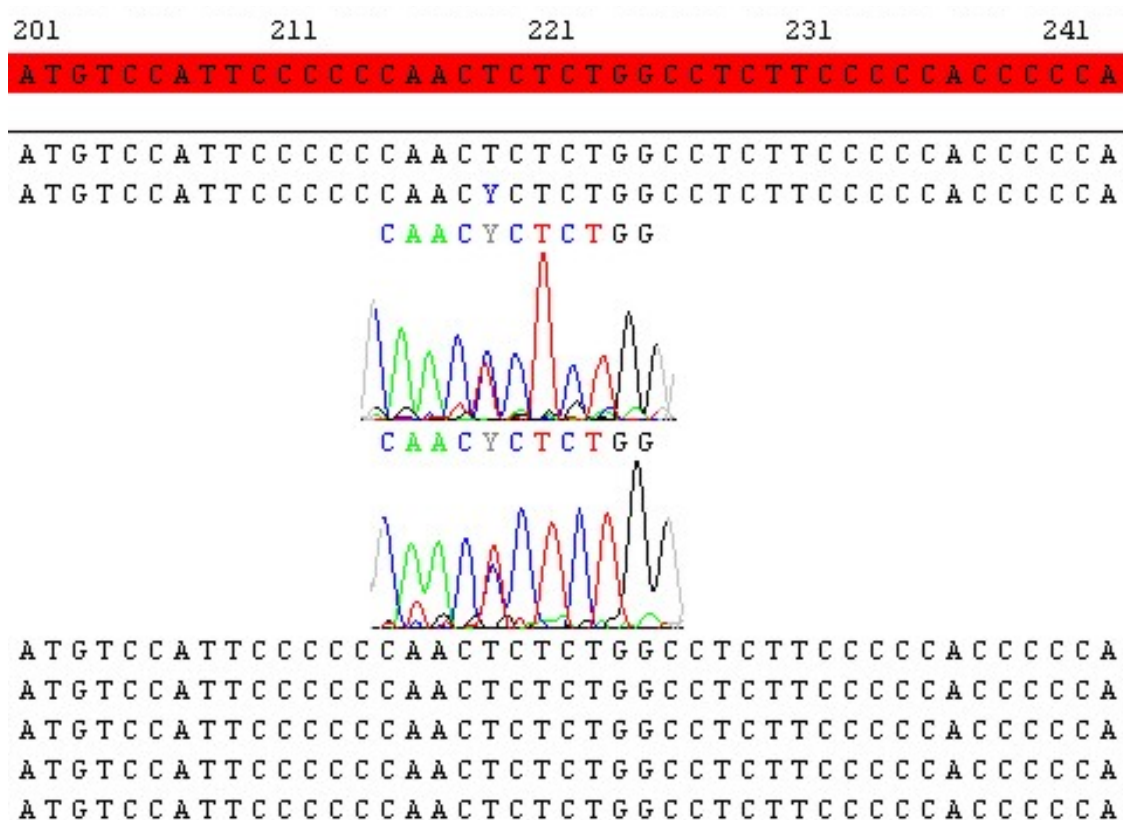


Abbildung 15: Ausschnitt der Intron3-Sequenz des *KCNC3*-Gens. Der Basencode Y steht für eine Heterozygotie der Basen Thymin und Cytosin. Dargestellt ist die Patientenprobe 1110.

### **5. Diskussion**

In dieser Arbeit wurden 46 vorselektierte Patienten auf SCA13 getestet. Alle untersuchten Patienten wiesen eine langsam progrediente Ataxie mit zumeist positiver Familienanamnese auf. Zuvor wurden SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 und SCA17 (Repeatexpansionen), sowie SCA14, SCA19, SCA23 und SCA28 (Punktmutationscreening) ausgeschlossen.

#### **5.1. Häufigkeit der SCA13**

Als seltene Erkrankung wird eine Krankheit mit einer relativen Prävalenz von  $<5$  pro 10.000 Einwohner bezeichnet. Die Prävalenz der SCAs wird insgesamt auf 0-5,6/100.000 Einwohner geschätzt (van de Warrenburg et al., 2002; Ruano et al., 2014) und kann somit zu den seltenen Erkrankungen gezählt werden. In den Niederlanden wurde für ADCA eine Prävalenz von 3,0/100.000 (van de Warrenburg et al., 2002), in Brasilien 1,9/100.000 (Ruano et al., 2014; Sun et al., 2016) und in Portugal 5,6/100.000 (Coutinho et al., 2013; Sun et al., 2016) beschrieben. Dies zeigt, dass die Häufigkeit von ADCA regional unterschiedlich ist. Es stellt sich hier die Frage, ob die scheinbar geographischen Abweichungen auch tatsächlich auf regionale Unterschiede oder auf Aspekte des jeweiligen Erhebungsprozesses zurückzuführen sind (z.B. die unterschiedliche Anzahl getesteter Personen in den betreffenden Studien).

Die verschiedenen Subtypen kommen je nach geografischer Lage ebenfalls unterschiedlich häufig vor, was auf Gründereffekte zurückzuführen ist (Klockgether, 2008). Auf Kuba gibt es vor allem SCA2 und in Portugal vermehrt SCA3. Weltweit stellt SCA3 mit 20-25 % der SCAs die größte Gruppe dar (Finsterer, 2009).

Die Häufigkeit der SCA13 ist derzeit nicht bekannt. SCA13 ist bislang erst in ein paar Familien weltweit diagnostiziert worden. Aufgrund der GC-reichen Exons ist eine Testung auf SCA13 erschwert und auch deshalb derzeit nicht in der Routinediagnostik zu finden. Die auf Next-Generation-Sequencing basierenden Panel-Diagnostiken zeigen bei stark GC-reichen DNA-Abschnitten Einschränkungen (Chen et al., 2013b). Die Prävalenz an SCA13 könnte also höher liegen, als zurzeit beschrieben.

In dieser Arbeit wurden mehrere Polymorphismen festgestellt. Auf deren Häufigkeit wird im Abschnitt 5.2.1. eingegangen. Im Rahmen der Arbeit wurde eine Variante (c.-6C>A) identifiziert, die potentiell pathologisch einzustufen ist. Unter Berücksichtigung dieser

Variante würde sich im untersuchten Kollektiv eine Häufigkeit von 2,22 Prozent ergeben. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um ein kleines Kollektiv von 46 Patienten handelt, die an einer autosomal dominant vererbten Ataxie erkrankt waren. Figueroa und Kollegen fanden bei 327 auf SCA13 untersuchten Patienten mit Ataxie, eine Patientin mit einer krankheitsverursachenden Mutation. Dies ergibt eine Häufigkeit von 0,3 Prozent (Figueroa et al., 2011). 2010 konnten bei 260 untersuchten Ataxie-Patienten mit autosomal dominanter Familienanamnese bei fünf Probanden eine SCA13 verursachende Mutation nachgewiesen werden. Somit lag bei dieser Arbeit die Häufigkeit der SCA13 bei 1,9 Prozent (Figueroa et al., 2010). In den Niederlanden wurde eine Prävalenz für SCA13 von etwa 0,6-1,3 % beschrieben (Duarri et al., 2015b). Weltweit wird die Häufigkeit der SCA13 auf weniger als ein Prozent geschätzt (Durr, 2010). Damit ist das weltweit Vorkommen der SCA13 deutlich seltener als bei den CAG-Repeat-Expansions-SCAs wie SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6.

### **5.2. Genetik der SCA13**

#### **5.2.1. Identifizierte Polymorphismen im *KCNC3*-Gen**

In dieser Arbeit konnten mehrere exonische und intronische SNPs nachgewiesen werden. In Exon 1 wurde bei einem Patienten der bekannte Polymorphismus an Position 188 (c.188A>G) gefunden. Laut Literaturangaben liegt die Häufigkeit des Auftretens des Adenins bei 4,8 % und des Guanins bei 95,2 % (EVA\_EXAC). In dieser Doktorarbeit waren ähnliche Werte nachweisbar. 98 % der untersuchten Proben hatten an Position 188 ein Guanin. Drei Patienten wiesen eine unbekannte Variante an Position 141 (c.141C>G) auf. In der Sequenzierung zeigte der G-Peak nicht den identischen Ausschlag wie der C-Peak. Zudem waren Hintergrundsignale vorhanden. Es könnte sich somit auch um ein Sequenzierungsartefakt handeln. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte mit einem weiteren Primer, der den Gegenstrang sequenziert, eine normale Sequenzabfolge bestimmt werden. Es lag also zunächst ein Sequenzierartefakt vor.

In Exon 2 wurde an Position 1674, 1677, 1788 und 1891 jeweils bei einem Probanden eine unbekannte Variante (c.1674G>A; c.1677G>A; c.1788G>A; c.1891C>T) entdeckt. An Position 1929 fand sich eine bekannte Variante (c.1929C>T). Dieser SNP liegt in der Bevölkerung laut Literaturangaben bei 1 % vor (Auton et al., 2015; 1000 Genomes, 2018). In der hier untersuchten Studienpopulation lag die Häufigkeit für das seltene Allel bei etwa 2 %.

Außerdem konnte eine bislang nicht beschriebene Variante in Exon 3 an Position 2082 (c.2082G>A) in Form einer stillen Mutation nachgewiesen werden. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes hat nicht jeder Basenaustausch innerhalb eines Exons eine Auswirkung auf die Aminosäure-Sequenz.

In Intron 3 hatten drei Patienten ein Thymin anstatt ein Cytosin an Position +14 (c.2170+14C>T). 99 % der Menschen weltweit haben an dieser Stelle ein C und 1 % ein A oder T. In Europa wurde Thymin bei 2 % der Bevölkerung festgestellt (Ensembl genome browser 92). In der vorliegenden Arbeit ist T bei 6,5 % nachweisbar. Dies lässt eine höhere Prozentzahl in Europa vermuten. Weiterhin wurde eine bekannte Variante in Intron 3 (26 Basen vor dem Exon 4 (c.2171-26T>C)) mit einer Häufigkeit von 2 % gefunden. Weltweit liegt laut Literaturangaben die Häufigkeit dieser Variante bei 3 % und in Europa bei 1 % (Auton et al., 2015; 1000 Genomes, 2018). Bei all diesen Sequenzänderungen handelt es sich um gutartige Varianten.

Mit einer Studienteilnehmeranzahl von 46 kann keine signifikante Aussage über die Häufigkeiten getroffen werden. Insgesamt ähneln jedoch die errechneten Häufigkeiten des Auftretens dieser Arbeit denen von Studien mit größeren Fallzahlen.

### 5.2.2. Identifizierte potentielle Mutation im *KCNC3*-Gen

Ein Patient wies einen Austausch im nicht-codierenden 5' (UTR) Bereich des *KCNC3*-Gens (NM\_004977.2:c.-6C>A) auf. Es handelt sich um einen Austausch von Cytosin zu Adenin (c.-6C>A) (rs111909830). In Datenbanken (ExAC-Browser) wurde diese Variante lediglich einmal in einem Kollektiv von 3224 untersuchten Personen beschrieben. Die Variante aus den Datenbanken konnte einem Asiaten zugeordnet werden, jedoch liegen keine Informationen zu seinem Alter und Gesundheitsstatus vor. Sie befindet sich im erweiterten Bereich der Kozak-Sequenz, sechs Basen entfernt von dem Startcodon der Translation (c.-6C>A) (Ensembl genome browser 92) und könnte dadurch einen Einfluss auf den Beginn der Translation haben.

Die Kozak-Sequenz befindet sich um das Translationsstartcodon in der mRNA. 5'-GCCGCC(A/G)CCATGG-3' ist die beschriebene Konsensus-Sequenz bei Wirbeltieren. Sie wird von Ribosomen erkannt und ist für die Initiation der Proteinbiosynthese von Bedeutung (Kozak, 1984; Kozak, 1987a; Kozak, 1987b). Afshar-Kharghan und Kollegen zeigten, dass die Änderung einer Base im Bereich der erweiterten Kozak-Sequenz eine große Rolle für die Translationseffizienz haben kann. Ein Polymorphismus von Thymin

zu Cytosin im Plättchenadhäsionsrezeptor Glykoprotein Ib ist 5 Basen vom Translationsstartcodon entfernt. Dieser Austausch führt zu einer erhöhten Expression des Rezeptors. Durch diese Variante nähert sie sich der als optimal beschriebenen Sequenz (Kozak-Sequenz) an (Kozak, 1984; Afshar-Kharghan et al., 1999; Grzegorski et al., 2014). Dagegen führt der Basenaustausch -6G>C im 5'UTR-Bereich des *GATA4*-Gens zu einer Reduktion der Translation. Durch eine verringerte Translationseffizienz kommt es zu einem verringerten Proteinspiegel. Es wird angenommen, dass die Variante an der Entstehung eines Vorhofseptumdefektes beteiligt ist (Mohan et al., 2014). -6G>C im  $\beta$ -Globin-Gen wird mit der  $\beta$ -Thalassämie in Verbindung gebracht. Es verringert die Translationsrate, während die Transkription nicht beeinflusst wird (De Angioletti et al., 2004).

Die in dieser Arbeit gefundene Variante ist ebenfalls in der erweiterten Kozak-Sequenz lokalisiert. Die Cytosin zu Adenin Transversion innerhalb der von Kozak beschriebenen Sequenz könnte einen Unterschied in der Translationseffizienz hervorrufen.

Bei der in 16q22.1-gekoppelten ADCA in einem Kollektiv asiatischer Patienten konnte eine Variante im 5'UTR-Bereich des *PLEKHG4*-Gens nachgewiesen werden. Da die c.-16C>T Variante intrafamiliär jedoch nicht bei allen Erkrankten auftrat, ist die Einstufung der Variante fraglich (Ishikawa et al., 2005; Amino et al., 2007). Unseres Wissens ist es die einzige 5'UTR-Variante, die bisher mit dem Auftreten einer SCA verknüpft wurde.

Aufgrund einer seltenen Frequenz (MAF (A) 0.00016) und der Position der Variante (sechs Basen vom Translationsstartcodon entfernt und im erweiterten Translationsstart-Bereich) kann es bei der in dieser Arbeit identifizierten Variante um eine pathologische Variante handeln. Um weitere Anhalte dafür zu erlangen, wurden Angehörige des Patienten auf das Vorliegen der c.-6C>A (rs111909830) Variante getestet. Die Mutter zeigte keine klinischen Auffälligkeiten und auch keine Mutation. Der Vater stand nicht zur Testung zur Verfügung. Bei dem deutlich jüngeren Bruder des Indexpatienten wurde die Variante nachgewiesen. Bis jetzt zeigt er jedoch keine klinischen Symptome. Dies könnte einerseits dafürsprechen, dass die Variante nicht der Auslöser der Gangstörung ist. Andererseits kann eine reduzierte Penetranz zugrunde liegen und die Variante somit dennoch krankheitsverursachend sein. Der jüngere Bruder kann im Laufe seines Lebens noch Symptome entwickeln. Dann wäre die Variante wie bei dem Indexpatienten der Familie mit einem späten Krankheitsbeginn verbunden.



### 5.2.3. Auswirkungen von Aminosäure-Substitutionen in KCNC3 und KCND3

Eine Punktmutation im *KCNC3*-Gen verursacht die SCA13. Das Protein-Produkt des *KCNC3*-Gens ist der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv3.3. Bei den bekannten Mutationen p.Arg420His und p.Arg423His, die den Spannungsmesser S4 beeinflussen, handelt es sich um „loss-of-function“-Mutationen. Bei der bekannten Mutation p.Phe448Leu, die auf der für das Öffnen und Schließen des Kanals zuständigen S5-Domäne lokalisiert ist, wurde dagegen eine verlängerte Deaktivierung nachgewiesen (Waters et al., 2006; Zhang und Kaczmarek, 2015).

Der Austausch p.Arg420His führt zu einer Reduzierung der Kanalaktivität, beeinflusst jedoch im Gegensatz zu p.Arg423His und p.Phe448Leu nicht das kinetische Verhalten oder das Spannungsverhalten des Kanals. Dies könnte erklären, warum p.Arg420His einen späten Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter hat und nicht wie p.Arg423His und p.Phe448Leu bereits im Kindesalter auftritt (Waters et al., 2006; Minassian et al., 2012; Zhang und Kaczmarek, 2015).

Kürzlich wurde eine weitere Mutation p.Pro583\_Pro585del beschrieben. Träger dieser Mutation zeigen nicht nur die SCA13-typischen Symptome, sondern zusätzlich eine Spastik. Wie die Variante G592R befindet auch sie sich in der C-terminalen Region des *KCNC3*-Gens. Sie führen zu einer verringerten Inaktivierungsrate. Ein anti-apoptotisches Protein HCLS1-assoziiertes X-1 (HAX1) bindet an die zytoplasmatische C-terminale Domäne. Dieses ist für die Reorganisation des kortikalen Aktinzytoskeletts über den Aktin ähnlichen Protein 2/3-Komplex (Arp 2/3-Komplex) verantwortlich. Die Mutationen können Einfluss auf HAX1 und somit auf das Überleben von Kleinhirnneuronen haben (Zhang et al., 2016; Khare et al., 2018).

Bei der SCA19 handelt es sich ebenfalls um eine Mutation in einem Kv-Kanal. Sie wird durch Mutationen im *KCND3*-Gen hervorgerufen. Das Protein-Produkt des *KCND3*-Gens ist der spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv4.3. Es kommt ebenfalls zur Reduzierung der Kanalaktivität (p.Thr352Pro) oder zur Veränderung des kinetischen Verhaltens des Kanals. Dieses ähnliche Verhalten könnte auf einen gemeinsamen Pathomechanismus der verschiedenen KV-assoziierten Krankheiten hindeuten (Duarri et al., 2012; Lee et al., 2012; Duarri et al., 2015a).

### 5.2.4. Auswirkung von Mutationen im 5' untranslatierten Bereich

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Variante c.-6C>A (rs111909830) kann nicht nur die Translation beeinflussen (siehe 5.2.2), sondern durch die Nähe zum Promotor auch die Transkription. Varianten in der 5'UTR-Region können die Transkription von mRNA verringern wie bei der Thalassämie intermedia (Sgourou et al., 2004). Krankheitsverursachende Mutationen im Promotorbereich können beispielsweise bei Beta-Thalassämien festgestellt werden. 1982 konnte zum ersten Mal eine Mutation im Bereich der TATA-Box nachgewiesen werden. Bei einem Patienten mit Beta-Thalassämie wurde ein Austausch von Adenin zu Cytosin in der TATA-Box des *HBB*-Gens festgestellt (c.-28A->C) (Poncz et al., 1982). Bis jetzt wurden über 37 Varianten in der Promotorregion des *HBB*-Gens nachgewiesen. Diese zeigten nicht in jedem Fall einen Einfluss auf die Promotoraktivität, in vielen Fällen waren sie aber für eine milde Ausprägung der Beta-Thalassämie verantwortlich (Hardison et al., 2002; Vooght et al., 2009; Ropero et al., 2017).

Ein bereits vorbeschriebener Pathomechanismus in der Promotorregion liegt bei der SCA17 vor. Hier ist das *TATA-Box-Bindungs-Protein-Gen* (*TBP*) auf Chromosom 6 mutiert (Imbert et al., 1994; Nakamura, 2001; Zühlke et al., 2001). Das TBP-Protein ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors IID. Dieser wird zur Bildung des Präinitiationskomplexes benötigt, sodass die RNA-Polymerase die Promotor-Elemente erkennt und mit der Transkription beginnen kann (Heinrich et al., 2014; <https://www.uniprot.org/uniprot/P20226>). Als Mutationsmechanismus der SCA17 kommen sowohl „gain of function“- als auch „loss of function“-Aspekte in Betracht. Mutiertes TBP bindet stärker an Transkriptionsfaktoren (gain of function), wodurch es zur Veränderung von Genexpressionen kommt. Zum Beispiel interagiert mutiertes TBP stärker mit Spezifitätsprotein 1 (Sp1), sodass weniger Sp1 an den Tyrosinkinase Rezeptor A-Promotor bindet und somit die TrkA-Expression verringert wird (Shah et al., 2009; Yang et al., 2016). Die SCA17 gehört zu den Polyglutamin-Erkrankungen. Eine Expansion des Polyglutamins (gain of function) hat eine verminderte Bindung des TBPs mit der DNA zur Folge. In Mausmodellen führte das mutierte TBP zu neuronaler Toxizität (Friedman et al., 2008). Der muskelspezifische Transkriptionsfaktor myogenes Differenzierungsprotein 1 (MyoD1) bindet hingegen weniger an mutiertes TBP als an Wildtyp-TBP, sodass dessen Funktion deutlich eingeschränkt ist (loss of function) (Huang et al., 2015; Yang et al., 2016).

Ähnlich der oben beschriebenen Mutationen kann auch die in dieser Arbeit beschriebene Variante c.-6C>A Einfluss auf die Transkription haben, was mithilfe von funktionellen Analysen getestet werden könnte (siehe 5.4.).

### **5.3. Empfehlung zur molekulargenetischen Testung auf SCA13**

SCA13 wurde erst in ein paar Familien weltweit diagnostiziert. Die Prävalenz der SCA13 ist bisher nicht bekannt. Laut Figueroa und Kollegen liegt sie zwischen 0,3 Prozent (Figueroa et al., 2011) und 1,9 Prozent (Figueroa et al., 2010). Von einer isolierten Testung auf SCA13 bei Patienten mit unbekannter Ursache einer autosomal dominant vererbten Ataxie kann daher abgeraten werden. Zudem kommt bei SCA13 die schwierige und zeitaufwendige Testung aufgrund der GC-reichen Exons erschwerend hinzu.

Mit einer Panel-Diagnostik könnte die Testung auf eine SCA erleichtert werden. Bei einer Panel-Diagnostik werden mit Hilfe des Next-Generation-Sequencing gleichzeitig mehrere für den Phänotyp in Frage kommende Genorte untersucht. Klinisch ist es meist nicht möglich, eine spinocerebelläre Ataxie einem Typ zu zuordnen. Gerade für heterogene Krankheitsbilder kann eine Panel-Diagnostik gegenüber einer Gen-für-Gen-Sequenzierung schneller und kostengünstiger durchgeführt werden. Mit Hilfe der Panel-Diagnostik konnten einige neue SCA-Typen entdeckt werden. So wurde z.B. SCA47 mithilfe von Sequenzierung des gesamten Exoms (whole exome sequencing) diagnostiziert (Gennarino et al., 2018; Kniffin, 2018). Jedoch bestehen bei dieser Diagnostik im Falle der SCA13 Schwierigkeiten aufgrund der GC-reichen Exons (Chen et al., 2013a). Bei Repeat-Mutationen ist eine Panel-Diagnostik ebenfalls nicht durchführbar.

Die häufigsten SCA-Typen SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6 sind Triplet-Repeat-Expansionen. Daher muss weiterhin bei Verdacht auf eine SCA zunächst eine Fragmentlängenbestimmung für diese Loci durchgeführt werden. Nach dem Ausschluss dieser SCA-Typen sollte im Rahmen einer Stufendiagnostik weiter vorgegangen werden. So können danach die seltenen Triplet-Repeat-Expansions-Erkrankungen SCA8, SCA10, SCA12, SCA17 und DRPLA ausgeschlossen werden. Im Anschluss an die Testung auf die Repeat-Expansion-Erkrankungen können mit Hilfe einer Panel-Diagnostik SCA-Typen, denen eine Punktmutation zugrunde liegt (siehe Tabelle 1), untersucht werden.

Sofern auf SCA13 getestet wird, sollte zunächst mit Exon 2 begonnen werden. In diesem befinden sich die bis jetzt beschriebenen pathologischen Varianten (Pulst, 2012). Erst anschließend sollte das gesamte *KCNC3*-Gen sequenziert werden. Es bietet sich dabei an, das GC-reiche und große Exon 1 in drei Bereiche einzuteilen (siehe 3.3.2.). Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde gezeigt, dass putativ pathogene Varianten auch außerhalb von Exon 2 zu finden sind.

### **5.4. Ausblick und kritische Wertung**

Durch häufigere Untersuchungen auf SCA13 könnte die Prävalenz weltweit steigen. Eine erhöhte Fallzahl von SCA13 birgt die Möglichkeit, weitere Aussagen bezüglich des Krankheitsbildes, seiner Pathophysiologie und Ausprägung zu treffen und mögliche Therapieansätze zu finden. 22 Gruppen aus neun europäischen Ländern haben über 3 Jahre Daten von SCA Patienten gesammelt und somit das bis jetzt größte, standardisierte DNA-Register (EUROSCA-R) von SCA Patienten zusammengestellt. Das Ziel dieses Projektes ist es, neue Genloci zu finden und mehr über den Erkrankungsbeginn, Frühsymptome, das Fortschreiten und mögliche Therapieansätze der heterogenen SCA-Typen herauszufinden.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Variante c.-6C>A könnte krankheitserregend sein. Folgende Punkte sprechen für eine Pathogenität der Mutation c.-6C>A:

1. Die Variante befindet sich in der erweiterten Kozak-Sequenz.
2. Es sind bereits krankheitsverursachende Mutationen in anderen Genen an der Position -6 beschrieben worden (siehe 5.2.2.).

Gegen die Pathogenität der Mutation spricht, dass:

1. der Bruder des Indexpatienten zwar die Variante aufzeigt, jedoch bis jetzt keine Symptome zeigt.

Eine funktionelle Analyse der in dieser Arbeit gefundenen Variante an Position c.-6C>A kann weitere Aussagen bezüglich der Pathologie ermöglichen. Zum einen kann so die Translationseffizienz der Variante im Vergleich zum Wildtyp getestet werden. Zum anderen kann der Einfluss der Variante auf die Promotoraktivität untersucht werden.

Der Einfluss der Variante auf die Transkriptionsaktivität kann in vitro getestet werden. Dabei wird zum einen der DNA-Abschnitt, der die Variante beinhaltet und zum anderen

der Wildtyp DNA-Abschnitt jeweils zusammen mit einem Reportergen in ein Plasmid geklont. Anschließend können mit den Plasmiden Zellen transfiziert werden. Anhand der Aktivität des Reportergens kann die Effizienz der Variante im Vergleich zum Wildtyp bezogen auf das nachfolgende Genprodukt beurteilt werden (Maston et al., 2006). Die Auswirkung der Variante auf die Promotoraktivität kann beispielsweise mithilfe eines Luciferase-Assays untersucht werden. Bei einem Promotor-Assay wird ein Reportergen hinter der Promotorregion eingebracht. Dabei korreliert die Promotoraktivität mit der Reportergenexpression, die mit Hilfe von Absorption, Fluoreszenz oder Biolumineszenz (z.B. Luciferase) bestimmt werden kann (Reinard, 2010; Smale, 2010).

Wird zusätzlich eine quantitative-Echtzeit PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung des mRNA-Levels durchgeführt, kann mittels oben beschriebener Methode auch eine Aussage bezüglich der Translation getroffen werden (Wang et al., 2007). Dabei werden mithilfe der qRT-PCR die mRNA-Levels von Wildtyp und Variante beinhaltender Zellen bestimmt. Weisen beide Zelltypen ähnliche mRNA-Levels auf, aber Unterschiede in der quantitativen Proteinanalyse, so spricht dies für eine verminderte Translationseffizienz.

### **6. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurden 46 vorselektierte deutsche Patienten mit einer autosomal dominant vererbten Gangstörung auf SCA13 getestet. SCA13 ist eine neurodegenerative Erkrankung. Zu den charakteristischen Symptomen einer spinocerebellären Ataxie gehören unkoordinierter Bewegungsabläufe (Ataxie), Augenbewegungsstörungen (Blickrichtungsnystagmus) und Sprechstörungen (Dysarthrie). Zusätzliche Symptome wie Pyramidenbahnzeichen, Epilepsie, Hörschaden oder kognitive Einschränkungen können bei SCA13 auftreten. Hervorgerufen wird SCA13 durch eine Punktmutation im *KCNC3*-Gen auf dem Chromosom 19. Das Protein-Produkt des *KCNC3*-Gens ist der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv3.3 (= KCNC3).

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere bekannte und unbekannte Polymorphismen festgestellt werden. Ein Patient wies einen Austausch von Cytosin zu Adenin an Position c.-6C>A (rs111909830) im nicht-codierenden Bereich des *KCNC3*-Gen auf. Die Variante hat eine seltene Frequenz (MAF (A) 0.00016) und liegt in der erweiterten Kozak-Sequenz bzw. in der Nähe zum Promotor. Durch eine mögliche Beeinflussung von Transkription und/oder Translation könnte es sich um eine krankheitsauslösende Variante handeln. Die bis jetzt bekannten SCA13-Mutationen sind Punktmutationen im codierenden Bereich. Die in dieser Arbeit gefundene Variante (c.-6C>A) befindet sich dagegen im nicht-codierenden Bereich. Von 46 getesteten Patienten wies einer eine putativ krankheitsverursachende Variante auf.

SCA13 ist bis jetzt erst in ein paar Familien weltweit diagnostiziert worden. Auch wenn mittlerweile versucht wird, SCA13 in SCA-Panels zu integrieren, gehört die Testung der SCA13 aufgrund der GC-reichen Exons nicht zur Routinediagnostik. Somit ist nicht auszuschließen, dass die Prävalenz der SCA13 höher liegt, als zurzeit beschrieben. Eine Testung auf SCA13 sollte jedoch nach Ausschluss der häufigeren SCA-Typen durchgeführt werden.

### **7. Summary**

Within this study, 46 preselected German patients with an autosomal dominant hereditary gait disorder were tested for SCA13. SCA13 is a neurodegenerative disease. Typical symptoms of spinocerebellar ataxia include uncoordinated movements (ataxia), eye movement disorders (gaze-evoked nystagmus), and dysarthria. Additional symptoms such as pyramidal tract signs, epilepsy, auditory deficits, or cognitive impairment may occur with SCA13. SCA13 is caused by point mutations in the *KCNC3* gene on chromosome 19. The protein product of the *KCNC3* gene is the voltage-gated potassium channel Kv3.3 (= KCNC3).

This study detected several known and unknown polymorphisms. One patient had an exchange of cytosine to adenine at position c.-6C>A (rs111909830) in the non-coding region of the *KCNC3* gene. The variant has a rare frequency (MAF (A) 0.00016) and is located in the extended Kozak sequence or in the vicinity of the promoter. A possible influence on transcription and / or translation could be a disease-triggering variant. The heretofore known SCA13 mutations are point mutations within the coding region. In contrast, the variant (c.-6C>A) found in this survey is located in the non-coding region. Out of the 46 patients tested, one patient had a putative disease-causing variant.

SCA13 has only been diagnosed in a few families worldwide so far. Even though SCA13 is now being attempted to be integrated into SCA panels, SCA13 testing is not a routine diagnostic due to GC-rich exons. Thus, it cannot be ruled out that the prevalence of SCA13 is higher than currently described. Testing for SCA13 should, however, be performed after exclusion of the more common SCA types.

### **8. Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
ADCA	autosomal dominante cerebelläre Ataxie
A	Adenin
A	Ampere
Ala	Alanin (A)
ARCA	autosomal rezessiv cerebelläre Ataxie
Arg	Arginin (R)
Arp 2/3-Komplex	Aktin ähnliche Protein 2/3-Komplex
Asn	Asparagin (N)
Asp	Asparaginsäure (D)
AS	Aminosäure
AT	Ataxie Teleangiektasie
c	centi
c	Konzentration
C	Cytosin
cDNA	codierende DNA
cM	centimorgan
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
CPEO	Chronische-progressive externe Ophthalmoplegie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubrale-pallidolysale Atrophie
EA	episodische Ataxie
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FRDA	Friedreich-Ataxie
g	Gramm
G	Guanin
Gly	Glycin (G)
HAX1	HCLS1-assoziiertes X-1
His	Histidin (H)
IQ	Intelligenzquotient



IVS	Intervening sequence
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
l	Liter
Leu	Leucin (L)
LHON	Hereditäre Leber-Optikus-Neuropathie
LOD	logarithm of the odds
Lys	Lysin (K)
m	Meter
μ	Mikro
m	Milli
MAF	Minor-Allelfrequenz
MELAS	Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnliche Episoden
MERRF	Myoklonusepilepsie mit Ragged Red Fasern
Met	Methionin (M)
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
MMS	Mini-Mental-Status
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MyoD 1	myogenes Differenzierungsprotein 1
n	nano
NARP	Neuropathie, Ataxie, Pigment-Retinopathie
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
p	pico
Phe	Phenylalanin (F)
Pro	Prolin (P)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehung pro Minute
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SCAR	autosomal rezessive spinocerebelläre Aaxie
sec	Sekunde

## 8. Abkürzungsverzeichnis

---

Ser	Serin (S)
SNP	single nucleotide polymorphism
Sp1	Spezifitätsprotein 1
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBP	TATA-Box-Bindungs-Protein
Thr	Threonin (T)
TrkA	Tyrosinkinase Rezeptor A
Val	Valin (V)
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

**9. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Häufigkeiten der SCA-Typen weltweit.....	12
Abbildung 2: Weltweites Auftreten der SCA-Subtypen.....	13
Abbildung 3: Transkripte des <i>KCNC3</i> -Gens.....	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Kv3.3. ....	20
Abbildung 5: Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	30
Abbildung 6: Ausschnitt der Exon1-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	38
Abbildung 7: Ausschnitt der Exon1-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	39
Abbildung 8: Abbildung des Übergangs der Exon1-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	40
Abbildung 9: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	41
Abbildung 10: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	42
Abbildung 11: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	43
Abbildung 12: Ausschnitt der Exon2-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	44
Abbildung 13: Ausschnitt der Exon3-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens.....	45
Abbildung 14: Ausschnitt der Intron3-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens. ....	46
Abbildung 15: Ausschnitt der Intron3-Sequenz des <i>KCNC3</i> -Gens. ....	47

### **10. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten SCA-Typen .....	7
Tabelle 2: Maligne Mutationen im <i>KCNC3</i> -Gen .....	15
Tabelle 3: Beispiele für Varianten im <i>KCNC3</i> -Gen.....	15
Tabelle 4: Pipettierschema .....	31
Tabelle 5: Herkunft der Proben .....	37
Tabelle 6: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 1 .....	38
Tabelle 7: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 1 .....	39
Tabelle 8: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 1 .....	40
Tabelle 9: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 2 .....	41
Tabelle 10: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 2 .....	42
Tabelle 11: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 2 .....	43
Tabelle 12: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 2 .....	44
Tabelle 13: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 3 .....	45
Tabelle 14: Darstellung einer Sequenzänderung im Intron 3 .....	46
Tabelle 15: Darstellung einer Sequenzänderung im Exon 4 .....	47

## **11. Literaturverzeichnis**

1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation (2018). Online verfügbar unter <http://www.internationalgenome.org/>, zuletzt geprüft am 02.08.2018.

Abele, M. (2002): The aetiology of sporadic adult-onset ataxia. In: *Brain* 125 (5), S. 961-968.

Afshar-Kharghan, V.; Li, C. Q.; Khoshnevis-Asl, M.; Lopez, J. A. (1999): Kozak Sequence Polymorphism of the Glycoprotein (GP) Iba Gene Is a Mayor. In: *BLOOD* 94/1.

Alonso, E.; Martínez-Ruano, L.; Biase, I. de; Mader, C.; Ochoa, A.; Yescas, P. et al. (2007): Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22 (7), S. 1050-1053.

Angioletti, M. de; Lacerra, G.; Sabato, V.; Carestia, C. (2004): Beta+45 G --> C. A novel silent beta-thalassaemia mutation, the first in the Kozak sequence. In: *British journal of haematology* 124(2), S. 224-231.

Arias, M.; Quintans, B.; Garcia-Murias, M.; Sobrido, M. J. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 36. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).

Auton, A.; Brooks, L. D.; Durbin, R. M.; Garrison, E. P.; Khang, H. M.; Korbel, J. O. et al. (2015): A global reference for human genetic variantion. In: *Nature* 526 (7571), S. 68-74.

Avery, A.; Crain, J.; Thomas, D. D.; Hays, T. S. (2016): A human  $\beta$ -III-spectrin spinocerebellar ataxia type 5 mutation causes high-affinity F-actin binding. In: *Sci. Rep.* 6, S. 21375.

Ayhan, F.; Ikeda, Y.; Dalton, J. C.; Day, J. W.; Ranum, L. P. W. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 8. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).

Bakalkin, G.; Watanabe, H.; Jezierska, J.; Depoorter, C.; Verschuuren-Bemelmans, C.; Bazov, I. et al. (2010): Prodynorphin Mutations Cause the Neurodegenerative Disorder Spinocerebellar Ataxia Type 23. In: *The American Journal of Human Genetics* 87 (5), S. 593-603.

Bird, T. D. (1998, updated 2016): Hereditary Ataxia Overview. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).

Boonkongchuen, P.; Pongpakdee, S.; Jindahra, P.; Papsing, C.; Peerapatmongkol, P.; Wetchaphanphesat, S. et al. (2014): Clinical analysis of adult-onset spinocerebellar ataxias in Thailand. In: *BMC neurology* 14, S. 75.

Bösch, S. (2007): Ataxie. In: *focus neurogeriatrie* 1 (3), S. 14-17.

Brown, S. S. G.; Stanfield, A. C. (2015): Fragile X premutation carriers: A systematic review of neuroimaging findings. In: *Journal of the neurological sciences* 352 (1-2), S. 19-28.

- Brusco, A.; Gellera, C.; Cagnoli, C.; Saluto, A.; Castucci, A.; Michielotto, C. et al. (2004): Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. In: *Archives of neurology* 61 (5), S. 727-733.
- Brusse, E.; Maat-Kievit, J. A.; van Swieten, J. C. (2007): Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. In: *Clinical genetics* 71 (1), S. 12-24.
- Brussino, A.; Brusco, A.; Durr, A. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 28 In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).
- Bryer, A.; Krause, A.; Bill, P.; Davids, V.; Bryant, D.; Butler, J. et al (2003): The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. In: *Journal of the neurological sciences* 216 (1), S. 47-54.
- Ceballos-Baumann, A. O.; Conrad, B. (2005): Bewegungsstörungen. 2. aktualisierte und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Chen, D. H.; Bird, T. D.; Raskind, W. H. (2005 updated 2013a): Spinocerebellar Ataxia Type 14. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).
- Chen, Y.-C.; Liu, T.; Yu, C.-H.; Chiang, T.-Y.; Hwang, C.-C. (2013b): Effects of GC bias in next-generation-sequencing data on de novo genome assembly. *PloS one* 8 (4), e62856.
- Chun, H. H.; Gatti, R. A. (2004): Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. In: *DNA repair* 3 (8-9), S. 1187-1196.
- Cintra, V. P.; Lourenço, C. M.; Marques, S. E.; Oliveira, L. M. de; Tumas, V.; Marques, W. (2014): Mutational screening of 320 Brazilian patients with autosomal dominant spinocerebellar ataxia. In: *Journal of the neurological sciences* 347 (1-2), S. 375-379.
- Clark, D.; Pazdernik, N. (2009): Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 106-110.
- Coutinho, P.; Ruano, L.; Loureiro, J. L.; Cruz, V. T.; Barros, J.; Tuna, A. et al. (2013): Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal. A population-based prevalence study. In: *JAMA neurology* 70 (6), S. 746-755.
- D'Adamo, M. C.; Hasan, S.; Guglielmi, L.; Servettini, I.; Cenciarini, M.; Catacuzzeno, L. et al. (2015): New insights into the pathogenesis and therapeutics of episodic ataxia type 1. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9, S. 317.
- Delplanque, J.; Devos, D.; Huin, V.; Genet, A.; Sand, O.; Moreau, C. et al. (2014): TMEM240 mutations cause spinocerebellar ataxia 21 with mental retardation and severe cognitive impairment. In: *Brain* 137 (10), S. 2657-2663.
- Duarri, A.; Jezierska, J.; Fokkens, M.; Meijer, M.; Schelhaas, H. J.; den Dunnen, W. F. A. et al. (2012): Mutations in potassium channel *kcnk3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Annals of neurology* 72 (6), S. 870-880.

- Duarri, A.; Lin, M.-C. A.; Fokkens, M. R.; Meijer, M.; Smeets, C. J. L. M.; Nibbeling, E. A. R. et al. (2015a): Spinocerebellar ataxia type 19/22 mutations alter heterocomplex Kv4.3 channel function and gating in a dominant manner. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (17), S. 3387-3399.
- Duarri, A.; Nibbeling, E. A. R.; Fokkens, M. R.; Meijer, M.; Boerrigter, M.; Verschuuren-Bemelmans, C. C. et al. (2015b): Functional analysis helps to define KCNC3 mutational spectrum in Dutch ataxia cases. In: *PloS one* 10 (3), e0116599.
- Durr, A. (2010): Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. In: *The Lancet. Neurology* 9 (9), S. 885-894.
- Ensembl genome browser 92. Online verfügbar unter <https://www.ensembl.org/index.html>, zuletzt geprüft am 02.08.2018.
- Figueroa, K. P.; Minassian, N. A.; Stevanin, G.; Waters, M.; Garibyan, V.; Forlani, S. et al. (2010): KCNC3: phenotype, mutations, channel biophysics-a study of 260 familial ataxia patients. In: *Human mutation* 31 (2), S. 191-196.
- Finsterer, J. (2004): Mitochondriopathies. In: *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 11 (3), S. 163-186.
- Finsterer, J. (2009): Ataxias with autosomal, x-chromosomal or maternal Inheritance. In: *Can J Neurol Sci.* 36 (04), S. 409-428.
- Friedman, M. J.; Wang, C.-E.; Li, X.-J.; Li, S. (2008): Polyglutamine expansion reduces the association of TATA-binding protein with DNA and induces DNA binding-independent neurotoxicity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (13), S. 8283-8290.
- Fujioka, S.; Sundal, C.; Wszolek, Z. K. (2013): Autosomal dominant cerebellar ataxia type III: a review of the phenotypic and genotypic characteristics. In: *Orphanet journal of rare diseases* 8, S. 14.
- Garden, G. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 7. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).
- Gennarino, V. A.; Palmer, E. E.; McDonell, L. M.; Wang, L.; Adamski, C. J.; Koiré, A. et al. (2018): A Mild PUM1 Mutation Is Associated with Adult-Onset Ataxia, whereas Haploinsufficiency Causes Developmental Delay and Seizures. In: *Cell* 172 (5), S. 924-936.e11.
- Ghanshani, S.; Pak, M.; McPherson, J. D.; Strong, M.; Dethlefs, B.; Wasmuth, J. J. et al. (1992): Genomic organization, nucleotide sequence, and cellular distribution of a Shaw-related potassium channel gene, Kv3.3, and mapping of Kv3.3 and Kv3.4 to human chromosomes 19 and 1. In: *Genomics* 12 (2), S. 190-196.
- Goldman-Wohl, D. S.; Chan, E.; Baird, D.; Heintz, N. (1994): Kv3.3b: a novel Shaw type potassium channel expressed in terminally differentiated cerebellar Purkinje cells and deep cerebellar nuclei. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (2), S. 511-522.
- Gros-Louis, F.; Dupré, N.; Dion, P.; Fox, M. A.; Laurent, S.; Verreault, S. et al. (2007): Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. In: *Nat Genet* 39 (1), S. 80-85.

- Grzegorski, S. J.; Chiari, E. F.; Robbins, A.; Kish, P. E.; Kahana, A. (2014): Natural variability of Kozak sequences correlates with function in a zebrafish model. In: *PloS one* 9 (9): e108475.
- Gutman, G. A.; Chandy, K. G.; Grissmer, S.; Lazdunski, M.; McKinnon, D.; Pardo, L. A. et al. (2005): International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. In: *Pharmacological reviews* 57 (4), S. 473-508.
- Hacke, W. (2010): Die neurologische Untersuchung und die wichtigsten Syndrome. In: Werner Hacke (Hg.): Neurologie. 13. vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 3-77.
- Hardison, R. C.; Chui, D. H. K.; Giardine, B.; Riemer, C.; Patrinos, G. P.; Anagnou, N. et al. (2002): HbVar. A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. In: *Human mutation* 19 (3), S. 225-233.
- Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L.; Löffler, G. (Hg.) (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Springer-Verlag, Berlin.
- Hennerici, M.; Bänzner, H. (2001): Gangstörungen. Grundlagen und computergestützte Ganganalyse : mit 23 Tabellen. Springer-Verlag, Berlin [u.a.].
- Herman-Bert, A.; Stevanin, G.; Netter, J. C.; Rascol, O.; Brassat, D.; Calvas, P. et al. (2000): Mapping of Spinocerebellar Ataxia 13 to Chromosome 19q13.3-q13.4 in a Family with Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia and Mental Retardation. In: *The American Journal of Human Genetics* 67 (1), S. 229-235.
- Houlden, H. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 11. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).
- Huang, S.; Yang, S.; Guo, J.; Yan, S.; Gaertig, M. A.; Li, S.; Li, X.-J. (2015): Large Polyglutamine Repeats Cause Muscle Degeneration in SCA17 Mice. *Cell reports* 13 (1), S. 196-208.
- Ikeda, Y.; Dick, K. A.; Weatherspoon, M. R.; Gincel, D.; Armbrust, K. R.; Dalton, J. C. et al. (2006): Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. In: *Nat Genet* 38 (2), S. 184-190.
- Imbert, G.; Trottier, Y.; Beckmann, J.; Mandel, J. L. (1994): The gene for the TATA binding protein (TBP) that contains a highly polymorphic protein coding CAG repeat maps to 6q27. In: *Genomics* 21 (3), S. 667-668.
- Infante, J.; Combarros, O.; Volpini, V.; Corral, J.; Llorca, J.; Berciano, J. (2005): Autosomal dominant cerebellar ataxias in Spain: molecular and clinical correlations, prevalence estimation and survival analysis. In: *Acta neurologica Scandinavica* 111 (6), S. 391-399.
- Irie, T.; Matsuzaki, Y.; Sekino, Y.; Hirai, H. (2014): Kv3.3 channels harbouring a mutation of spinocerebellar ataxia type 13 alter excitability and induce cell death in cultured cerebellar Purkinje cells. In: *The Journal of physiology* 592 (1), S. 229-247.



- Ishikawa, K.; Toru, S.; Tsunemi, T.; Li, M.; Kobayashi, K.; Yokota, T. et al. (2005): An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. In: *American journal of human genetics* 77 (2), S. 280-296.
- Issa, F. A.; Mock, A. F.; Sagasti, A.; Papazian, D. M. (2012): Spinocerebellar ataxia type 13 mutation that is associated with disease onset in infancy disrupts axonal pathfinding during neuronal development. In: *Disease models & mechanisms* 5 (6), S. 921-929.
- Jacobi, H.; Du Montcel, S.T.; Bauer, P.; Giunti, P.; Cook, A.; Labrum, R. et al. (2015): Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6. A longitudinal cohort study. In: *The Lancet Neurology* 14 (11), S. 1101-1108.
- Jahnson, M.; Rothhämel, S. (Hg.) (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Aufl. Elsevier GmbH, München.
- Jayadev, S.; Bird, T. D. (2013): Hereditary ataxias: overview. In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 15 (9), S. 673-683.
- Juvonen, V.; Hietala, M.; Kairisto, V.; Savontaus, M.-L. (2005): The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. In: *Acta neurologica Scandinavica* 111 (3), S. 154-162.
- Kalman, K.; Nguyen, A.; Tseng-Crank, J.; Dukes, I. D.; Chandy, G.; Hustad, C. M. et al. (1998): Genomic organization, chromosomal localization, tissue distribution, and biophysical characterization of a novel mammalian Shaker-related voltage-gated potassium channel, Kv1.7. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5851-5857.
- Khare, S.; Galeano, K.; Zhang, Y.; Nick, J. A.; Nick, H. S.; Subramony, S. H. et al. (2018): C-terminal proline deletions in KCNC3 cause delayed channel inactivation and an adult-onset progressive SCA13 with spasticity. In: *Cerebellum (London, England)*.
- Klockgether, T. (2008): The clinical diagnosis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 7 (2), S. 101-105.
- Kniffin, C. L. (2018): Spinocerebellar ataxia 47. Online verfügbar unter <https://www.omim.org/entry/617931?search=SCA47&highlight=sca47>, zuletzt geprüft am 16.07.2018.
- Knight, M. A. (2004): Dominantly inherited ataxia and dysphonia with dentate calcification. Spinocerebellar ataxia type 20. *Brain* 127 (5), S. 1172-1181.
- Knight, M. A.; Hernandez, D.; Diede, S. J.; Dauwerse, H. G.; Rafferty, I.; van de Leemput, J. et al. (2008): A duplication at chromosome 11q12.2–11q12.3 is associated with spinocerebellar ataxia type 20. In: *Human Molecular Genetics* 17 (24), S. 3847-3853.
- Kornblum, C. (2012): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Mitochondriale Erkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Online verfügbar unter: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-049l\\_S1\\_Mitochondriale\\_Erkrankungen\\_2012\\_abgelaufen.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-049l_S1_Mitochondriale_Erkrankungen_2012_abgelaufen.pdf), zuletzt geprüft am 02.08.2018.

- Kozak, M. (1984): Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. In: *Nature* 308 (5956), S. 241-246.
- Kozak, M. (1987a): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. In: *Nucleic acids research* 15 (20), S. 8125-8148.
- Kozak, M. (1987b): At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. In: *Journal of molecular biology* 196 (4), S. 947-950.
- Lee, Y.-C.; Durr, A.; Majczenko, K.; Huang, Y.-H.; Liu, Y.-C.; Lien, C.-C. et al. (2012): Mutations in KCND3 cause spinocerebellar ataxia type 22. In: *Annals of neurology* 72 (6), S. 859-869.
- Liu, X.-L.; Wang, T.; Huang, X.-J.; Zhou, H.-Y.; Luan, X.-H.; Shen J.-Y. et al. (2016): Novel ATM mutations with ataxia-telangiectasia. In: *Neuroscience letters* 611, S. 112-115.
- Margolis, R. L.; O'Hearn, E.; Holmes, S. E.; Srivastava, A. K.; Mukherji, M.; Sinha, K. K. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 12. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Maruyama, H.; Izumi, Y.; Morino, H.; Oda, M.; Toji, H.; Nakamura, S.; Kawakami, H. (2002): Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. In: *American journal of medical genetics* 114 (5), S. 578-583.
- Maston, G. A.; Evans, S. K.; Green, M. R. (2006): Transcriptional regulatory elements in the human genome. In: *Annual review of genomics and human genetics* 7, S. 29-59.
- Matsuura, T.; Ashizawa, T. (1993): Spinocerebellar Ataxia Type 10. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- McKay, B. E.; Turner, R. W. (2004): Kv3 K<sup>+</sup> channels enable burst output in rat cerebellar Purkinje cells. In: *The European journal of neuroscience* 20 (3), S. 729-739.
- Minassian, N. A.; Lin, M.-C. A.; Papazian, D. M. (2012): Altered Kv3.3 channel gating in early-onset spinocerebellar ataxia type 13. In: *The Journal of physiology* 590 (7), S. 1599-1614.
- Mohan, R. A.; van Engelen, K.; Stefanovic, S.; Barnett, P.; Ilgun, A.; Baars, M. J. H. et al. (2014): A mutation in the Kozak sequence of GATA4 hampers translation in a family with atrial septal defects. In: *American journal of medical genetics. Part A* 164A (11), S. 2732-2738.
- Moseley, M. L.; Benzow, K. A.; Schut, L. J.; Bird, T. D.; Gomez, C. M.; Barkhaus, P. E. et al. (1998): Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. In: *Neurology* 51 (6), S. 1666-1671.
- Muthuswamy, S.; Agarwal, S. (2015): Friedreich Ataxia: From the eye of a molecular biologist. In: *The neurologist* 20 (3), S. 51-55.
- Nakamura, K. (2001): SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. In: *Human Molecular Genetics* 10 (14), S. 1441-1448.

Nolte, D.; Müller, U. (2006): Punktmutationen und Deletionen bei spinocerebellären Ataxien. In: *Neuroforum* (4), S. 260–265.

OMIM Phenotypic Series - PS164400. Online verfügbar unter <http://omim.org/phenotypicSeries/PS164400>, zuletzt geprüft am 02.08.2018.

Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E.; Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.) (1993): GeneReviews(R). University of Washington, Seattle. Seattle (WA).

Parolin Schnekenberg, R.; Perkins, E. M.; Miller, J. W.; Davies, W. I. L.; D'Adamo, M. C.; Pessia, M. et al. (2015): De novo point mutations in patients diagnosed with ataxic cerebral palsy. In: *Brain : a journal of neurology* 138 (Pt 7), S. 1817-1832.

Pfeffer, G.; Blakely, E. L.; Alston, C. L.; Hassani, A.; Boggild, M.; Horvath, R. et al. (2012): Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83 (9), S. 883-886.

Poncz, M.; Ballantine, M.; Solowiejczyk, D.; Barak, I.; Schwartz, E.; Surrey, S. (1982): beta-Thalassemia in a Kurdish Jew. Single base changes in the T-A-T-A box. In: *The Journal of biological chemistry* 257 (11), S. 5994-5996.

Pulst, S. M. (1998 updated 2015): Spinocerebellar Ataxia Type 2. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).

Pulst, S. M. (2006 updated 2012): Spinocerebellar Ataxia Type 13. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E., Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).

Reinard, T. (2010): Molekularbiologische Methoden. 1. Aufl. Eugen Ulmer KG, Stuttgart.

Rentschler, A. (2010): Mutationsanalyse des PRKCG- (SCA14) und FGF14-Genes (SCA27) mittels dHPLC bei Ataxie-Patienten. Online verfügbar unter: [https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/handle/10900/45643/pdf/microsoft\\_word\\_abgabefassung\\_22\\_04.pdf?sequence=1](https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/handle/10900/45643/pdf/microsoft_word_abgabefassung_22_04.pdf?sequence=1), zuletzt geprüft am 02.08.2018.

Ruano, L.; Melo, C.; Silva, M. C.; Coutinho, P. (2014): The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia. A systematic review of prevalence studies. In: *Neuroepidemiology* 42 (3), S. 174-183.

Sakai, H.; Yoshida, K.; Shimizu, Y.; Morita, H.; Ikeda, S.; Matsumoto, N. (2010): Analysis of an insertion mutation in a cohort of 94 patients with spinocerebellar ataxia type 31 from Nagano, Japan. In: *Neurogenetics* 11 (4), S. 409-415.

Saldarriaga, W.; Tassone, F.; González-Teshima, L. Y.; Forero-Forero, J. V.; Ayala-Zapata, S.; Hagerman, R. (2014) Fragile X syndrome. *Colombia médica (Cali, Colombia)* 45 (4), S. 190-198.

Salkoff, L.; Baker, K.; Butler, A.; Covarrubias, M.; Pak, M. D.; Wei, A. (1992): An essential 'set' of K<sup>+</sup> channels conserved in flies, mice and humans. In: *Trends in neurosciences* 15 (5), S. 161-166.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463-5467.

- Schöls, L.; Bauer, P.; Schmidt, T.; Schulte, T.; Riess, O. (2004): Autosomal dominant cerebellar ataxias. Clinical features, genetics, and pathogenesis. In: *The Lancet Neurology* 3 (5), S. 291-304.
- Sgourou, A.; Routledge, S.; Antoniou, M.; Papachatzopoulou, A.; Psiouri, L.; Athanassiadou, A. (2004): Thalassaemia mutations within the 5'UTR of the human beta-globin gene disrupt transcription. In: *British journal of haematology* 124 (6), S. 828-835.
- Shadrina, M. I.; Shulskaya, M. V.; Klyushnikov, S. A.; Nikopensius, T.; Nelis, M.; Kivistik, P. A. et al. (2016): ITPR1 gene p.Val1553Met mutation in Russian family with mild Spinocerebellar ataxia. In: *cerebellum ataxias* 3 (1), S. 351.
- Shah, A. G.; Friedman, M. J.; Huang, S.; Roberts, M.; Li, X.-J.; Li, S. (2009): Transcriptional dysregulation of TrkA associates with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 17. In: *Human Molecular Genetics* 18 (21), S. 4141-4152.
- Shen, N. V.; Pfaffinger, P. J. (1995): Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins. In: *Neuron* 14 (3), S. 625-633.
- Shieh, C. C.; Klemic, K. G.; Kirsch, G. E. (1997): Role of transmembrane segment S5 on gating of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. In: *The Journal of general physiology* 109 (6), S. 767-778.
- Smale, S. T. (2010): Luciferase assay. *Cold Spring Harbor protocols* 2010 (5), pdb.prot5421.
- Snyders, D. J. (1999): Structure and function of cardiac potassium channels. In: *Cardiovascular research* 42 (2), S. 377-390.
- Srivastava, A. K.; Choudhry, S.; Gopinath, M. S.; Roy, S.; Tripathi, M.; Brahmachari, S. K.; Jain, S. (2001): Molecular and clinical correlation in five Indian families with spinocerebellar ataxia 12. In: *Ann Neurol.* 50 (6), S. 796-800.
- Steinbach, P.; Gläser, D. (2009): Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik: Fragiles-X und Fragiles-X assoziiertes Tremor/Ataxie Syndrom. In: *medgen* 28 (4), S. 466-472.
- Steri, M.; Idda, M. L.; Whalen, M. B.; Orrù, V. (2018): Genetic variants in mRNA untranslated regions. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 9 (4), e1474.
- Stevanin, G.; Dürr, A.; Brice, A. (2000): Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology. In: *European journal of human genetics: EJHG* 8 (1), S. 4-18.
- Stoll, W. (1998): Schwindel und Gleichgewichtsstörungen. Diagnostik, Klinik, Therapie, Begutachtung ; ein interdisziplinärer Leitfaden für die Praxis ; 34 Tabellen. 3., überarb. und erw. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Storey, E. (2007, updated 2012): Spinocerebellar Ataxia Type 20. In: Pagon, R. A.; Adam, M. P.; Ardinger, H. H.; Wallace, S. E.; Amemiya, A.; Bean, L. J. H. et al. (Hg.): GeneReviews(R). Seattle (WA).
- Storey, E.; Du Sart, D.; Shaw, J. H.; Lorentzos, P.; Kelly, L.; McKinley Gardner, R. J. et al. (2000): Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia. In: *Am. J. Med. Genet.* 95 (4), S. 351-358.

- Sun, Y.-M.; Lu, C.; Wu, Z.-Y. (2016): Spinocerebellar ataxia. Relationship between phenotype and genotype - a review. In: *Clinical genetics* 90 (4), S. 305-314.
- Tang, B.; Liu, C.; Shen, L.; Dai, H.; Pan, Q.; Jing, L. et al. (2000): Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. In: *Archives of neurology* 57 (4), S. 540-544.
- TBP. - TATA-box-binding protein - Homo sapiens (Human) - TBP gene & protein (2018). Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/uniprot/P20226>, zuletzt geprüft am 02.08.2018.
- Vale, J.; Bugalho, P.; Silveira, I.; Sequeiros, J.; Guimarães, J.; Coutinho, P.; (2010): Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. In: *European journal of neurology* 17 (1), S. 124-128.
- van de Warrenburg, B. P. C.; Sinke, R. J.; Verschuuren-Bemelmans, C. C.; Scheffer, H.; Brunt, E. R.; Ippel, P. F. et al. (2002): Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. In: *Neurology* 58 (5), S. 702-708.
- Velazquez-Perez, L.; Santos, F. N.; Garcia, R.; Paneque, H. M.; Hechavarria, P. R. (2001): Epidemiology of Cuban hereditary ataxia. In: *Revista de neurologia* 32 (7), S. 606-611.
- Vooght, K. M. K. de; van Wijk, R.; van Solinge, W. W. (2009): Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. In: *Clinical chemistry* 55 (4), S. 698-708.
- Wang, J.; Lu, C.; Min, D.; Wang, Z.; Ma, X. (2007): A mutation in the 5' untranslated region of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes downregulation of translation efficiency. In: *The Journal of international medical research* 35 (4), S. 564-573.
- Waters, M. F. et al. (2005): An autosomal dominant ataxia maps to 19q13: Allelic heterogeneity of SCA13 or novel locus? In: *Neurology* 65 (7), S. 1111-1113.
- Waters, M. F.; Minassian, N. A.; Stevanin, G.; Figueroa, K. P.; Bannister, J. P. A.; Nolte, D. et al. (2006): Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. In: *Nature genetics* 38 (4), S. 447-451.
- Waters, M. F.; Pulst, S. M. (2008): Sca13. In: *Cerebellum (London, England)* 7 (2), S. 165-169.
- Wenning, G. K.; Colosimo, C.; Geser, F.; Poewe, W. (2004): Multiple system atrophy. In: *The Lancet Neurology* 3 (2), S. 93-103.
- Whaley, N. R.; Fujioka, S.; Wszolek, Z. K. (2011): Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: a review of the phenotypic and genotypic characteristics. In: *Orphanet journal of rare diseases* 6, S. 33.
- Wüllner, U.; Klockgether, T. (2003): Klinik und Therapie der Multisystematrophie. In: *Deutsches Ärzteblatt* 100 (7), A408-415.
- Yang, S.; Li, X.-J.; Li, S. (2016): Molecular mechanisms underlying Spinocerebellar Ataxia 17 (SCA17) pathogenesis. In: *Rare diseases (Austin, Tex.)* 4 (1), e1223580.
- Zhang, Y.; Kaczmarek, L. K. (2015): Kv3.3 potassium channels and spinocerebellar ataxia. In: *The Journal of physiology*.

Zhang, Y.; Zhang, X.-F.; Fleming, M. R.; Amiri, A.; El-Hassar, L.; Surguchev, A. A. et al. (2016): Kv3.3 Channels Bind Hax-1 and Arp2/3 to Assemble a Stable Local Actin Network that Regulates Channel Gating. In: *Cell* 165 (2), S. 434-448.

Zhao, J., Zhu, J., Thornhill, W. B. (2013): Spinocerebellar ataxia-13 Kv3.3 potassium channels: arginine-to-histidine mutations affect both functional and protein expression on the cell surface. In: *The Biochemical journal* 454 (2), S. 259-265.

Zühlke, C.; Hellenbroich, Y.; Dalski, A.; Kononowa, N.; Hagenah, J.; Vieregge, P. et al. (2001): Different types of repeat expansion in the TATA-binding protein gene are associated with a new form of inherited ataxia. In: *European journal of human genetics* : *EJHG* 9 (3), S. 160-164.

## **12. Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Lea-Theresa Ley

### **13. Danksagung**

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas, ihre hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie die kritischen Anmerkungen beim Verfassen dieser Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des molekulargenetischen Labors, speziell Frau Pia Winter und Frau Sylvia Stanek, danke ich für die Einarbeitung in die molekulargenetischen Methoden, ihre Hilfe und ihre vielen Ratschläge.

Vielen Dank an meine Familie und meine Freunde für ihre Unterstützung, ihre Ermutigungen, Korrekturlesen und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.